



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CAMPUS DE SOBRAL - CURSO DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA - PPGB**

**GISVANI LOPES DE VASCONCELOS**

**EFEITOS DO FATOR DE CRESCIMENTO E DIFERENCIAÇÃO-9 E DO HORMÔNIO  
FOLÍCULO ESTIMULANTE SOBRE O DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE  
FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS BOVINOS**

**SOBRAL**

**2012**

**GISVANI LOPES DE VASCONCELOS**

**EFEITOS DO FATOR DE CRESCIMENTO E DIFERENCIAÇÃO-9 E DO  
HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE SOBRE O DESENVOLVIMENTO *IN*  
*VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS BOVINOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – Curso de Medicina, da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Macromoléculas.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Viana Silva.

**SOBRAL**

**2012**

**GISVANI LOPES DE VASCONCELOS**

**EFEITOS DO FATOR DE CRESCIMENTO E DIFERENCIAÇÃO-9 E DO  
HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE SOBRE O DESENVOLVIMENTO *IN*  
*VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS BOVINOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Macromoléculas.

**Aprovada em 28/02/2012.**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. José Roberto Viana Silva – Orientador  
(Universidade Federal do Ceará – UFC)

---

Prof. Dra. Ana Paula Ribeiro Rodrigues - Examinadora  
(Universidade Estadual do Ceará – UECE)

---

Prof. Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha - Examinador  
(Universidade Estadual Vale do Acaraú- UVA)

Aos meus pais Orion e Vicência,  
pelo simples fato de existirem.

Com amor, dedico.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, primeiramente, por proteger meus passos, me iluminar, me dar forças para superar obstáculos e seguir em frente. Meu Deus, muito obrigada por sempre estar comigo em todos os momentos e pelo Senhor ser tão presente em minha vida. Com Cristo somos força, com Cristo somos força!

Aos meus amados e queridos pais, José Orion de Vasconcelos e Vicência Maria Lopes de Vasconcelos, pela educação, caráter e honestidade passados para mim. E por sempre me incentivar a estudar desde pequena! Eu amo muito vocês. Sem vocês eu não sou nada!!! Palavras não são suficientes para expressar os meus eternos agradecimentos.

Às minhas queridas e inúmeras irmãs: Gisleni Lopes, Giseli Lopes, Germânia Lopes, Lidiane Roncy, Viviane Roncy e Christiane Roncy por cada gesto, carinho, pelos bons momentos de convivência. Vocês são essenciais para mim!

Ao meu amado Bruno Rodrigues Magalhães, por ser tão querido, amável, paciente, amoroso, companheiro de todas as horas. Obrigada pelo apoio em todos os momentos da minha vida, por sempre me engrandecer e dizer que sou uma pessoa super inteligente e esforçada. Sou eternamente grata! “Eu sei que vou te amar, por toda a minha vida eu vou te amar”.

Aos meus sobrinhos queridos, Vívian e Dário Willian, por me proporcionarem momentos de alegria e por me fazerem voltar um pouco a ser criança. A tia ama muito vocês!

Agradeço a toda minha família, as minhas primas (os), em especial a minha priminha Yasmin. Às minhas tias (os), as minhas queridas avós, especialmente a minha querida avó Francisca Benedito (*in memoriam*) que lembro todos os dias de seus ensinamentos, de seu carinho com os netos e de sua comida tão deliciosa. Te amo minha vizinha!

Ao Prof. Dr. José Roberto Viana Silva, meu orientador querido, pela imensa paciência, pelos ensinamentos, sabedoria, pela humildade e simplicidade. Sou muito grata ao senhor. Obrigada por sempre está disponível nos momentos que eu preciso. Desde a época que eu era aluna de iniciação científica até hoje, me tornando Mestre! Obrigada pelo exemplo de vida!

À querida Dra. Viviane Saraiva, que chegou de mansinho no momento que mais precisávamos de uma lição de vida e de uma pessoa que nos dessem apoio incondicional! Vivi, muito obrigada, você é uma grande amiga, que nos faz ter orgulho de sermos agraciados por seus ensinamentos! Sou eternamente grata!

Às minhas amigas-irmãs Silvano Lima, Cinara Vasconcelos e Maria Augusta, que sempre enchem meu coração de alegria e de ânimo! Amo vocês Helenas.

Às minhas amigas lindas zootecnistas: Juliana Osterno, Natália Livia, Ismênia França e Luiza Castro pela grande amizade. Agradeço pelos anos maravilhosos de convivência que passei ao lado de vocês durante a graduação, nossa equipe sempre será a equipe show. Amo muito vocês e não importa à distância, nossa amizade sempre irá perdurar.

Aos meus queridos amigos Sávio Cavalcante, Neto Fontenele, Ângelo Tomasini, Emanuela Rebouças, Larisse Alves, Luana Rodrigues e Mariana Donato por sempre doarem o tempo de vocês quando preciso. Obrigada pelos momentos maravilhosos e de descontração que passo ao lado de vocês. Amo vocês meus queridos!

À família do meu namorado, em especial à Carol, que com seu jeito meigo, cativante e sereno e alegre me faz sentir tão bem. Amo seus beijinhos querida. Agradeço ao Luís Rodrigues, Pedro Henrique Rodrigues e a minha sogra: Mairla Rodrigues. Obrigada! Vocês são encantadores!

Agradeço a minha querida amiga Juliane Passos, por sempre estar do meu lado em todos os momentos, por me entender nas horas de fraqueza, de desespero. Sempre passávamos isso juntas e dizíamos: Amiga isso vai passar e vai dar tudo certo!! Minha nêga você é uma das pessoas mais queridas que conheço, você possui um coração muito puro e uma inteligência brilhante! Te amo muito minha linda! Espero sempre te encontrar para darmos boas risadas e comentar sobre a vida! Obrigada!

A meu amigo Anderson Weiny por sempre me fazer acreditar nos meus sonhos, no nosso ideal, por me fazer rir muito, com suas gírias e palavras engraçadas. Nos momentos mais obscuros e de desespero, estava lá o Anderson, calmo, confiante e sempre brincando. Você é um grande homem, sempre terá sucesso! Obrigada!

Ao amigo Jackson Costa, por sua grande inteligência, competência, generosidade, simplicidade, enfim, obrigada por sempre ser prestativo e amável. Agradeço também pelos seus momentos de chatice! Te amo querido! Você vai muito em frente, torço por você!

À minha amiga Regislane Pinto Ribeiro por ser tão prestativa, competente, animada, querida, por sempre estar apta a ajudar e nunca dizia não para mim. Sou orgulhosa de você, por sempre querer aprender, tanto na parte prática como na teórica! Você é um exemplo!

À minha amiga Moêmia Portela, por sempre me ouvir e me dar conselhos, por ser muito dedicada, engraçada, me mata de rir com suas loucuras. Eu te amo muito minha amiga! Nunca vou esquecer de você, nunca!

À minha amiga linda e loira Cintia Guedes, pelo apoio incondicional, por ser um exemplo de luta, perseverança e sucesso! Amiga, obrigada pelos ensinamentos primordiais que foram essenciais nessa trajetória. Torço muito por você, pelo seu sucesso não só na vida profissional, mas na vida pessoal. Te amo, te amo!

À equipe do grupo de pesquisa de Reprodução e Cultura de Células (UFC), Rodrigo Rossi, Glaucinete Borges, Katianne Freitas, Renato Passos, Diego Tavares, Karen dos Anjos e Gleison Ribeiro. Agradeço a cada um pela ajuda nos experimentos, desde a coleta até a escrita dos resultados, pelas correções da dissertação, pelas discussões durante as apresentações, pelos momentos agradáveis que só vocês podem proporcionar para esse grupo tão querido! Adoro vocês!

Aos integrantes do Laboratório de Manipulação de Oócitos e folículos ovarianos pré-antrais (LAMOFOPA – UECE), especialmente ao Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo, pelo apoio técnico e científico durante a realização deste trabalho. Agradeço também a Ivina Brito, Beatriz Duarte e Isadora Lima pela disposição, ensinamentos sobre o cultivo e microscopia de fluorescência. Agradeço ao Cleilson Silva e Rafael Rossetto por disponibilizar seu tempo sempre me ajudando no que for preciso. Muito obrigada!

Aos integrantes do Núcleo de Biotecnologia de Sobral, especialmente ao prof. Dr. Rodrigo Maranguape, por ser uma pessoa de imensa inteligência e por sempre está ali para ajudar. Agradeço ao João Garcia e Amélia Araújo, pelos ensinamentos e por sempre se dispor

a ajudar! Agradeço à Auxiliadora Oliveira pelo apoio técnico e a todos do NUBIS, como Áurea Morgana, Nyanne Hardy, Raulzito Fernandes, Tatiana Farias, Aurilene Gomes, Jedson Aragão, Vitória Soares, Cleane Moreira e Franciso de Sousa. Meu sincero obrigada!

Agradeço aos meus colegas de mestrado, como Daniele do Val, Flávio Evaristo, Manuela Almeida, Ellen de Vasconcelos, Ronaldo Farias, Nágila Carneiro, Gleiciane Queiroz, Robério Fiúza, Daniel de Brito, Joséires Fontenelle, Luciana de Castro e Nairley Sá pela amizade e companheirismo! Pessoas lindas somos mestres!

À Universidade Federal do Ceará (UFC) e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela oportunidade de realização de um Curso de Mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo apoio financeiro para as pesquisas, pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos durante a realização do Curso de Mestrado, fundamentais para a concretização de minhas atividades de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Cláudio Cabral Campello e à Débora Magalhães pela ajuda e disponibilidade durante a realização das estatísticas.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGB) da UFC, pelos ensinamentos diários passados.

Agradeço também a todos os funcionários da UFC, em especial ao Manoel Alcione, Sr. Almino, Sr. Antônio, Gade e Diná pelo carinho que têm por todos nós!

Aos integrantes da Banca Examinadora, Dra. Ana Paula Ribeiro Rodrigues e Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha, por terem gentilmente aceito o convite para participar da banca da defesa desta dissertação e pela disposição em contribuir no engrandecimento deste trabalho.

Agradeço a todos que não foram aqui mencionados, mas que direta ou indiretamente me ajudaram durante a realização deste trabalho. Os meus mais sinceros agradecimentos.



A todos, muito obrigada!

“... Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena acreditar no sonho que se tem, ou que os seus planos nunca vão dá certo ou que você nunca vai ser alguém... Quem acredita sempre alcança...”

(Renato Russo)

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar o papel do GDF-9 sozinho ou em combinação com FSH sobre a viabilidade, crescimento e expressão do RNAm para PCNA, HAS 1, HAS 2, versican e perlecan em folículos secundários bovinos cultivados *in vitro*. Para estudos *in vitro*, folículos secundários bovinos foram isolados e cultivados por doze dias, na presença de MEM sozinho ou suplementado com GDF-9 (200 ng/mL), FSH (D0-D6: 100 ng/mL e de D7-D12: 500 ng/mL) ou ambos. Diâmetro folicular, viabilidade e formação de antro foram avaliados durante o cultivo. Para avaliar os níveis de RNAm para PCNA, HAS 1, HAS 2, perlecan e versican em folículos após 12 dias de cultivo, o RNA total foi extraído e o cDNA foi sintetizado. Os níveis de RNAm foram quantificados por PCR em tempo real. O teste Kruskal-Wallis foi usado para comparar o diâmetro folicular. O teste Qui-quadrado foi utilizado para comparar a porcentagem de viabilidade e formação de antro de folículos após o cultivo *in vitro* ( $p < 0,05$ ), enquanto ANOVA seguido pelo teste de Tukey foram utilizados para avaliar os dados de expressão do RNAm nos folículos cultivados ( $p < 0,05$ ). Os resultados mostram que após 6 dias de cultivo, FSH sozinho ou associado com GDF-9 aumentaram o diâmetro folicular em relação ao meio controle. Além disso, após 12 dias de cultivo, FSH promoveu um aumento no diâmetro folicular, enquanto a associação de FSH com GDF-9 reduziu significativamente o diâmetro folicular quando comparado com folículos cultivados em MEM acrescido de FSH. Além disso, FSH e GDF-9 aumentaram a formação de antro após 12 dias de cultivo ( $P < 0,05$ ). Apesar de GDF-9 ter reduzido significativamente os níveis de RNA para HAS 1 quando comparado ao MEM, esse fator aumentou os níveis de versican e perlecan. Além disso, a presença de ambos FSH e GDF-9 aumentaram os níveis de RNAm para HAS 2, porém, reduziu os níveis de RNAm para PCNA. Além disso, FSH também atua reduzindo os níveis de RNAm para o PCNA. Em conclusão, FSH e/ou GDF-9 promovem o crescimento folicular e formação de antro, e GDF-9 estimula a expressão de versican e perlecan e interage positivamente com FSH para o aumento da expressão de HAS 2.

**Palavras-chave:** GDF-9, FSH, bovinos, cultivo *in vitro*, folículos pré-antrais, RNAm

## ABSTRACT

The aim of this study was to determine the role of GDF-9 alone or in combination with FSH on growth, viability and on the mRNA expression of PCNA, HAS 1, HAS 2, versican and perlecan in bovine secondary follicles cultured *in vitro*. For *in vitro* studies, bovine secondary follicles were isolated and cultured for twelve days in the presence of MEM alone or supplemented with GDF-9 (200 ng/mL), FSH (D0-D6: 100 ng/mL and of D7-D12: 500 ng/mL) or both. Follicular diameter, viability and antrum formation were evaluated during culture. To evaluate the mRNA levels for PCNA, perlecan, versican, HAS 1 and 2 in follicles after 12 days of culture, total RNA was extracted and cDNA was synthesized. The levels of mRNA were quantified by real time PCR. Kruskal-Wallis test were used to compare the follicular diameter. The chi-square test was used to compare the percentage of viability and antrum formation of follicles after *in vitro* culture ( $p < 0.05$ ), whereas ANOVA followed by Tukey's test were used to evaluate the mRNA expression data in cultured follicles ( $p < 0.05$ ). The results show that after 6 days of culture, FSH alone or associated with GDF-9 increased follicular diameter in relation to control medium. Moreover, after 12 days of culture, FSH promoted an increase in follicular diameter, while the association of FSH with GDF-9 significantly reduced follicular diameter when compared with follicles cultured in MEM plus FSH. Furthermore, FSH and GDF-9 increased the antrum formation after 12 days of culture ( $P < 0.05$ ). Despite GDF-9 had significantly reduced the levels of mRNA for HAS 1 when compared to MEM, this factor has increased the levels of versican and perlecan. In addition, the presence of both FSH and GDF-9 increased mRNA levels for HAS 2, but reduced level those for PCNA. In addition, FSH also acts by reducing mRNA levels for PCNA. In conclusion, FSH and/or GDF-9 promotes the follicular growth and antrum formation, and GDF-9 stimulates the expression of versican and perlecan and interact positively with FSH to the increased expression of HAS 2.

**Keywords:** GDF-9, FSH, bovine, *in vitro* culture, preantral follicles, mRNA

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1 - Destino dos folículos primordiais após sua formação: atresia folicular, transição para a fase de crescimento ou manutenção no estado primordial ..... 25
- Figura 2 - Via de sinalização PI3K, mostrando as moléculas que mantêm a dormência dos folículos primordiais incluindo PTEN, FOXO3, p27 e o complexo TSC1/TSC2, e as que mantêm a sobrevivência dos folículos primordiais, incluindo PI3K, PDK1, mTORC1, S6K1 e rpS6..... 27
- Figura 3 - União das subunidades da PCNA com a braçadeira deslizante que está ligada com a DNA polimerase..... 28
- Figura 4 - Fatores envolvidos no processo de recrutamento do estroma e proliferação/diferenciação das células da teca..... 30
- Figura 5 - Fatores que influenciam o crescimento dos folículos primários e secundários..... 31
- Figura 6 - Formação do fluido folicular decorrente da produção de proteoglicanos pelas células da granulosa..... 32
- Figura 7 - Via de sinalização celular do GDF-9, seus receptores do tipo I e II (ALK-5 e BMPRII) e os mensageiros intracelulares (SMADS 2, 3 e 4)..... 39

### ARTIGO I

- Figura 1 - Follicle isolated analyzed by fluorescence microscope (A, B) Preantral follicle cultured for 12 days in MEM (C, D) Preantral follicle cultured for 12 days in GDF-9 (E, F) Follicle preantral cultured for 12 days in GDF + FSH (G, H) Preantral

follicles cultured for 12 days in FSH. Scale bar represents 50 micrometers..... 69

Figura 2 - Expression of mRNA in bovine ovarian follicles (means  $\pm$  SD) A) HAS 1  
B) HAS 2 C) Versican D) Perlecan and E) PCNA..... 70

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Primer pairs used in real-time PCR for quantification of PCNA and proteins presents in the follicular fluid in cultured bovine follicles .....	65
Tabela 2 - Follicular diameter after culture of secondary follicles in MEM supplemented with GDF-9, FSH or both.....	66
Tabela 3 - Antrum formation after culture of secondary follicles in MEM supplemented with GDF-9, FSH or both.....	67
Tabela 4 - Follicular survival after culture of secondary follicles in MEM supplemented with GDF-9, FSH or both.....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Akt	Proteína kinase
ALK-5	Receptor semelhante à kinase-5
AMH	Hormônio Anti-mulleriano
as	Anti-senso
BMP	Proteína Morfogenética Óssea
BMP-4, 6, 7, 8b, 15	Proteína Morfogenética Óssea-4, -6, -7, -8b, 15
BMPRII	Receptor de BMP do tipo II
BSA	Albumina Sérica Bovina
°C	Graus Celsius
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CE	Ceará
CGPs	Células Germinativas Primordiais
CG	Células da granulosa
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
COX2	Ciclooxigenase 2
CT	Cycle threshold
CYP11A	Citocromo P450 11A
DNA	Ácido desoxirribonucléico



DNase	Desoxirribonuclease
dNTP	Desoxirribonucleotídeo Fosfatado
DTT	Dithiothreitol
E2	Estrógeno
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
FGF-2	Fator de Crescimento Fibroblástico-2
FGFb	Fator de Crescimento Fibroblástico Básico
FIGLA	Fator de Linhagem Germinativa Alfa
FOXO3	Forkhead transcription factor
FSH	Hormônio folículo estimulante
FUNCAP	Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico
G	Gauge
GAPDH	Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase
GDF-9	Fator de Crescimento e Diferenciação – 9
GH	Hormônio do Crescimento
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
H	Hora
HAS 1, 2 e 3	Hialuronidase sintetase 1, 2 e 3
HEPES	Ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2'-Etanossulfônico
IAP	Inibitórias de Proteínas de Apoptose
IGF-1	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina– 1

ITS	Insulina, transferrina e selênio
KGF	Fator de Crescimento do Keratinócito
KL	Kit-ligante
LAMOFOPA	Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-Antrais
LH	Hormônio luteinizante
LIF	Fator Inibidor da Leucemia
MEM	Meio Essencial Mínimo
MEM <sup>+</sup>	Meio essencial mínimo suplementado
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitros
Mm	Milímetro
mM	Milimolar
mTORC1	Complexo 1 do Alvo da Rapamicina em mamíferos
Ng	Nanograma
nm	Nanômetro
NUBIS	Núcleo de Biotecnologia de Sobral
$P < 0.05$	Probabilidade de erro menor do que 5%
$P > 0.05$	Probabilidade de erro maior do que 5%
P4	Progesterona
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular

PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
PDK1	Phosphoinositide-dependent kinase-1
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PIB	Produto Interno Bruto
PIP2	Fosfatidilinositol,4,5-trisfosfato
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato
PTEN	Homólogo da fosfatase e tensina deletado no cromossomo 10
p27	Inibidor de kinase dependente de ciclina
rFSH	FSH recombinante
R-FSH	Receptor para o hormônio folículo estimulante
R-LH	Receptor para o hormônio lutenizante
RNA	Ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucléico mensageiro
RNAse	Ribonuclease
RNAseout	Recombinant Ribonuclease Inhibitor
rpS6	Proteína Ribossomal S6
S	Senso
S6K1	Proteína ribossomal p70 ligada a quinase S61
Sec	Segundo
SEM	Erro padrão
SMAD	Mensageiro intracelular

STAR	Proteína Reguladora Aguda Esteroidogênica
STRA8	Gene 8 estimulado pelo ácido retinóico
TCM	Meio de cultivo de tecidos
TGF- $\beta$	Superfamília de fatores de crescimento transformante beta
TSC1	Proteína 1 de Esclerose Tuberosa
TSC2	Proteína 2 de Esclerose Tuberosa
U	Unidade
UBQ	Ubiquitina
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
VIP	Peptídeo Intestinal Vasoativo
ZP 1, 2 e 3	Zona pelúcida 1, 2 e 3
$\alpha$ -MEM	Meio Essencial Mínimo – $\alpha$
$\mu$ g	Micrograma
$\mu$ l	Microlitro
$\mu$ m	Micrômetro
$\mu$ M	Micromolar
$\pm$ SD	Mais ou menos o desvio padrão
%	Porcentagem
~	Aproximadamente

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>23</b>
<b>2.1. Formação do ovário e dos folículos primordiais.....</b>	<b>23</b>
<b>2.2. Ativação e crescimento de folículos primordiais.....</b>	<b>24</b>
<b>2.3. Crescimento de folículos primários e secundários.....</b>	<b>27</b>
<b>2.4. Crescimento dos folículos antrais (terciários e pré-ovulatórios).....</b>	<b>31</b>
<b>2.5. Atresia folicular.....</b>	<b>33</b>
<b>2.6. Sistemas de cultivo e técnicas de avaliação do desenvolvimento folicular <i>in vitro</i>.....</b>	<b>34</b>
<b>2.6.1. Sistemas de cultivo <i>in vitro</i>.....</b>	<b>34</b>
<b>2.6.2. Técnicas de avaliação do desenvolvimento folicular <i>in vitro</i>.....</b>	<b>35</b>
<b>2.7. Importância do Hormônio Folículo estimulante (FSH) no controle da foliculogênese <i>in vitro</i>.....</b>	<b>36</b>
<b>2.8. Importância do Fator de Crescimento e Diferenciação-9 (GDF-9) no controle da foliculogênese.....</b>	<b>38</b>
<b>2.8.1. Fator de Crescimento e Diferenciação – 9 (GDF-9).....</b>	<b>38</b>
<b>2.8.2. Efeitos do GDF-9 na foliculogênese pré-antral.....</b>	<b>39</b>
<b>2.8.3. Efeitos do GDF-9 na foliculogênese antral.....</b>	<b>41</b>
<b>3. PROBLEMAS E HIPÓTESES.....</b>	<b>42</b>
<b>4. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>43</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>45</b>
<b>5.1. Gerais.....</b>	<b>45</b>
<b>5.2. Específicos.....</b>	<b>45</b>
<b>6. ARTIGO I: Effects of GDF-9 and FSH on the <i>in vitro</i> development of bovine preantral follicles.....</b>	<b>46</b>
<b>7. CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>73</b>
<b>8. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>74</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>75</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As pesquisas vêm sendo realizadas com o propósito de criar oportunidades extraordinárias para a reprodução animal (TROUNSON *et al.*, 1998) e proporcionado uma grande revolução na multiplicação de animais de elevado potencial econômico, especialmente na espécie bovina. Atualmente o Brasil detém o segundo maior efetivo bovino do mundo, em torno de 190 milhões de animais, sendo que a produção de carne bovina representa cerca de 1,8% do Produto Interno Bruto - PIB (USDA, 2011). Desta forma, a realização de pesquisa que possibilitem uma rápida multiplicação de bovinos geneticamente superiores pode contribuir para o desenvolvimento da economia nacional. Nesse sentido, biotécnicas reprodutivas, tais como a inseminação artificial, sincronização de estro, fecundação *in vitro* e transferência de embriões são amplamente utilizadas. No entanto, grande parte destas biotécnicas priorizam o aproveitamento do potencial reprodutivo dos machos, mesmo diante do conhecimento de que o ovário mamífero mantém a fertilidade das fêmeas através de um estoque de oócitos imaturos inclusos em milhares de folículos pré-antrais, sendo portanto, prioritário o desenvolvimento de técnicas que utilize todo o potencial reprodutivo das fêmeas.

Ao nascimento, os ovários das fêmeas mamíferas contêm milhares de oócitos imaturos inclusos em folículos pré-antrais (primordiais, primários e secundários), que constituem o estoque de folículos ovarianos e será utilizado durante a vida reprodutiva das fêmeas. Estes folículos representam uma fonte potencial de gametas fertilizáveis, mas poucos desenvolvem-se até o estágio de folículo pré-ovulatório, pois a grande maioria morre por um processo denominado atresia (MARKSTRÖM *et al.*, 2002). Neste contexto, o desenvolvimento de um sistema de cultivo eficiente é de suma importância para o crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais até a obtenção de oócitos aptos a serem maturados e fertilizados *in vitro*, evitando assim as grandes perdas foliculares que ocorrem naturalmente *in vivo*. Além disso, o desenvolvimento desse sistema poderá contribuir para uma melhor compreensão dos diversos fatores implicados na foliculogênese inicial e no processo de atresia (FIGUEIREDO *et al.*, 2008). O estabelecimento de meios de cultivo adequados, associado com o estudo dos fatores que controlam o crescimento e a maturação folicular, possibilitarão o desenvolvimento de estratégias eficientes para o aproveitamento dos milhares de oócitos presentes em ovários bovinos.

A foliculogênese ovariana é um processo complexo que é controlado por uma interação entre fatores de crescimento locais, como Fator de Crescimento e Diferenciação – 9 (GDF-9)

e gonadotrofinas. O papel das gonadotrofinas, principalmente do hormônio folículo estimulante (FSH) tem sido elucidado nos últimos 10 anos (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005), e alguns estudos demonstraram que a adição de FSH no meio de cultivo promove a inibição de apoptose e formação de antro em grandes folículos secundários isolados de diferentes espécies (murina: MCGEE *et al.*, 1997a; humana: WRIGHT *et al.*, 1999; ovina: CECCONI *et al.*, 1999; bovina: GUTIERREZ *et al.*, 2000; suína: MAO *et al.*, 2002). Em relação ao GDF-9, esse fator promove o crescimento do oócito, proliferação de células da granulosa e diferenciação de células da teca em pequenos e grandes folículos antrais bovinos (SPICER *et al.*, 2006, 2008). Além disso, ORISAKA *et al.*, (2006) mostraram que o GDF-9 mantém a viabilidade e o crescimento folicular durante a transição da fase pré-antral para fase antral inicial em ratas.

Para uma melhor compreensão do impacto dessas substâncias sobre a foliculogênese ovariana em diferentes espécies, no decorrer deste trabalho, serão abordados aspectos relacionados ao desenvolvimento e atresia folicular, principais sistemas de cultivo, com ênfase na importância do FSH e do GDF-9 para o desenvolvimento de folículos pré-antrais, bem como as técnicas de avaliação do crescimento folicular *in vitro*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Formação do ovário e dos folículos primordiais

Os ovários dos mamíferos contêm milhares de células germinativas que serão utilizadas durante a vida reprodutiva da fêmea, desempenhando a função de liberação de oócitos maduros para a fertilização (McGEE & HSUEH, 2000). As células germinativas primordiais (CGPs) são derivadas do endoderma do saco vitelínico do embrião. Os principais fatores envolvidos na diferenciação destas células são os membros da família das proteínas morfogenéticas óssea (BMPs), especialmente a BMP-4 e a BMP-8b que são secretadas a partir do ectoderma extra-embrionário (LAWSON *et al.*, 1999, YING *et al.*, 2000). Após a proliferação celular, as células germinativas migram do saco vitelínico até a crista gonadal, onde colonizam a gônada primitiva, formando os cordões sexuais (PEPLING *et al.*, 2001; ADAMS *et al.*, 2008). A migração das CGPs do saco vitelínico para a crista gonadal é estimulada por diversos fatores, como o Kit Ligante (KL), que tem como função regular a migração, proliferação e/ou sobrevivência celular (GU *et al.*, 2009).

Após a colonização da crista gonadal, as CGPs continuam a divisão mitótica seguida de uma reorganização das organelas, originando as oogônias (SATHANANTHAN *et al.*, 2000). Estudos recentes mostraram que a ativação do receptor do ácido retinóico regula o início da meiose em camundonga (ANDERSON *et al.*, 2008). Isto sugere que os genes ativados pelo ácido retinóico, como o gene 8 (STRA8), podem ser importantes para sobrevivência oocitária em bovinos (KOSHIMIZU *et al.*, 1995) e camundongas (MENKE *et al.*, 2003). Com a interrupção da meiose I na fase de prófase, as oogônias diferenciam-se em oócitos primários (HIRSHFIELD, 1991). Em seguida, os oócitos irão ser circundados por uma camada de células da pré-granulosa, as quais podem ser derivadas do mesonéfron ou do epitélio da superfície ovariana (McNATTY *et al.*, 2000). Na grande maioria dos folículos primordiais recém formados, as células da pré-granulosa param de se multiplicar e entram num período de quiescência (SAWYER *et al.*, 2002), juntamente com o oócito.

Alguns hormônios regulam a formação dos folículos primordiais, dentre eles pode-se citar o Estradiol (E2) e a Progesterona (P4) que reduzem a quantidade de folículos formados durante o cultivo de ovários de camundongas recém-nascidas (CHEN *et al.*, 2007). O hormônio folículo estimulante (FSH) atua regulando a expressão do E2 no tecido ovariano durante a formação de folículos primordiais em hamster (WANG *et al.*, 2008). Outras



substâncias também estão envolvidas na formação dos folículos primordiais, como as caderinas, que são glicoproteínas de membrana presentes na superfície celular e são importantes para a morfogênese. As N-caderinas estão envolvidas na adesão das células somáticas com o oócito durante a formação de folículos primordiais, enquanto que as E-caderinas controlam a migração de oócitos durante a formação de folículos primordiais em hamster (WANG & ROY, 2010).

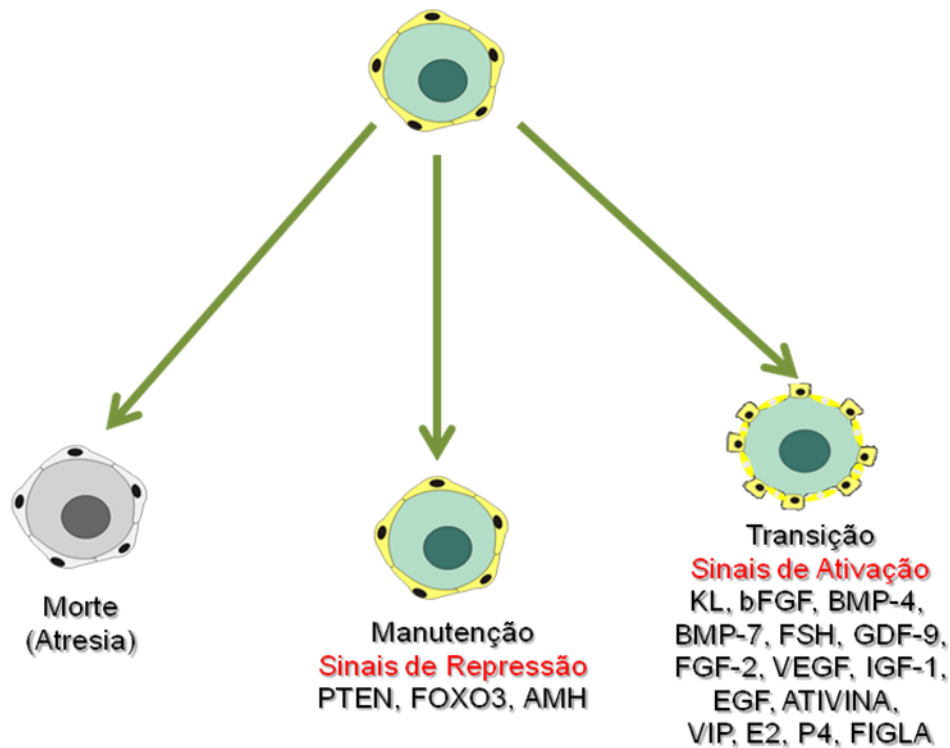
Após sua formação, alguns folículos primordiais podem iniciar o crescimento imediatamente ou entrar em quiescência, quando as células da pré-granulosa param de se multiplicar até receberem sinais para entrar no *pool* de folículos em crescimento (McGEE & HSUEH, 2000). O início do desenvolvimento dos folículos primordiais pode ocorrer dias, meses ou anos após a sua formação (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005), sendo considerado o maior evento biológico que controla o potencial reprodutivo das fêmeas (McLAUGHLIN & MCIVER, 2009).

## **2.2. Ativação e crescimento de folículos primordiais**

Após sua formação, os folículos primordiais podem seguir três possíveis destinos, ou seja, (1) morrer por atresia, (2) permanecer no estágio primordial ou (3) iniciar a transição para a fase de crescimento (Figura 1). O início do crescimento de folículos primordiais, também conhecido como ativação, é um processo que ocorre através da transição dos folículos do *pool* de reserva, ou folículos quiescentes, para o *pool* de folículos em crescimento (transição, primário, secundário, terciário e pré-ovulatório) (RÜSSE, 1983). O primeiro sinal da ativação folicular é a retomada da proliferação das células da granulosa, com a mudança na morfologia dessas células, que passam de pavimentosas para cúbicas, bem como o crescimento oocitário (HIRSHFIELD, 1991). A manutenção da quiescência, a sobrevivência e a ativação dos folículos primordiais são reguladas por complexos mecanismos moleculares coordenados por eventos inibitórios e/ou estimulatórios que envolvem diferentes substâncias.

Vários trabalhos destacaram a atuação de uma série de substâncias que estimulam esse processo de ativação tais como: BMP-4 (KNIGHT & GLISTER, 2006; McGEE & HSUEH, 2000), FSH (SILVA *et al.*, 2004), Fator de Crescimento e Diferenciação-9 - GDF-9 (MARTINS *et al.*, 2008), Fator de Crescimento fibroblástico-2 - FGF-2 (MATOS *et al.*, 2007), Fator de Crescimento do Endotélio Vascular - VEGF (BRUNO *et al.*, 2009), Fator de Crescimento Semelhante à Insulina- 1 - IGF-1 (MARTINS *et al.*, 2009), Fator de Crescimento Epidermal - EGF (SILVA *et al.*, 2004), Ativina-A (SILVA *et al.*, 2006),

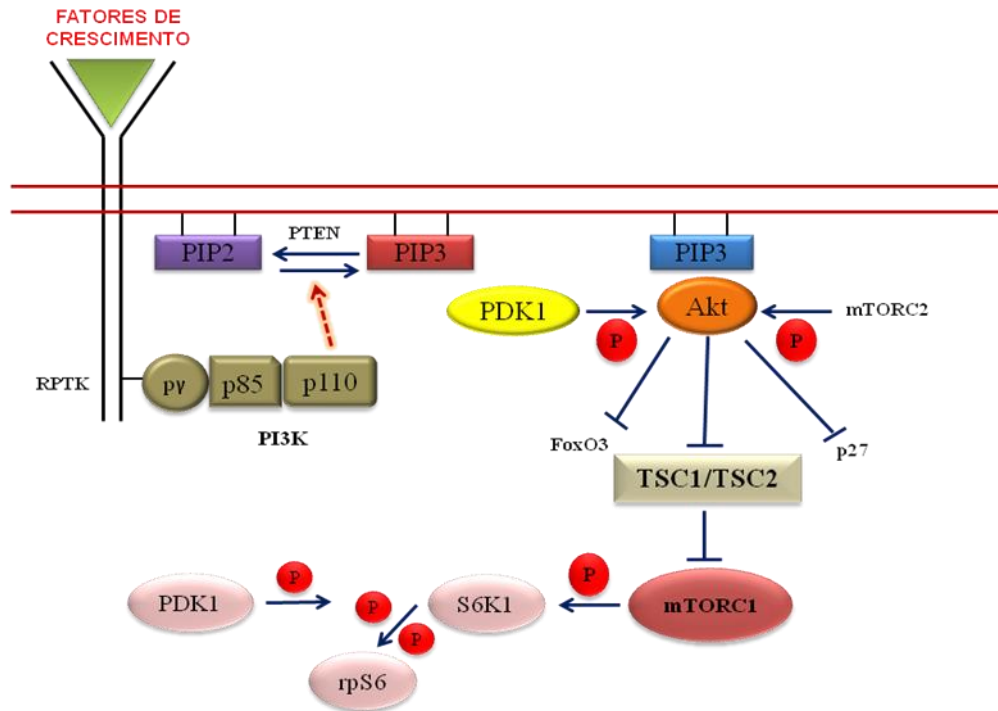
Peptídeo Intestinal Vasoativo - VIP (BRUNO *et al.*, 2010), E2, P4 (LIMA-VERDE *et al.*, 2010), Proteína Morfogenéticas Óssea -7- BMP-7 (ARAÚJO *et al.*, 2010) e Fator de Linhagem Germinativa Alfa - FIGLA (JOSHI *et al.*, 2007). Outros estudos *in vitro* mostram que o KL atua melhorando a sobrevivência celular em oócitos de folículos primordiais através da fosforilação da via da Proteína Kinase - Akt (REDDY *et al.*, 2005). Além disso, em ovários neonatais de ratas foi observado que o Fator de Crescimento Fibroblástico Básico (FGFb) pode promover a ativação dos folículos primordiais (NILSSON *et al.*, 2001) e esse efeito pode ser devido a sua capacidade de aumentar a expressão do KL (NILSSON & SKINNER, 2004) (Figura 1).



**Figura 1.** Destino dos folículos primordiais após sua formação: atresia folicular, transição para a fase de crescimento ou manutenção no estado primordial. Adaptado de TINGEN *et al.*, 2009.

Atualmente sabe-se que um dos principais fatores responsáveis pela quiescência dos folículos primordiais é o Forkhead transcription factor- FOXO3, um fator de transcrição que atua regulando a formação de folículos primordiais (CARLSSON & MAHLAPUU, 2002; JOHN *et al.*, 2007). O KL atua na fosforilação e supressão funcional do FOXO3, estimulando a saída dos folículos primordiais do estágio de dormência para sua ativação e posterior crescimento (LIU *et al.*, 2007). Em relação ao Hormônio Anti-mulleriano- AMH, esse fator atua suprimindo a ativação de folículos primordiais em camundongas (DURLINGER *et al.*,

2002) e mulheres (CARLSSON *et al.*, 2006). Alguns estudos mostram que a via fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) pode desempenhar um papel na regulação da ativação de folículos primordiais (LIU *et al.*, 2006; REDDY *et al.*, 2005). No entanto, o Homólogo da fosfatase e tensina deletado no cromossomo 10 (PTEN), uma fosfatase lipídica, conhecida como uma antagonista da via PI3K, provoca uma supressão da ativação dos folículos primordiais através da manutenção da dormência desses folículos (REDDY *et al.*, 2008). Além disso, em mulheres, a Proteína 1 de Esclerose Tuberosa (TSC1) possui a capacidade de suprimir a ativação folicular, regulando negativamente o Complexo 1 do Alvo da Rapamicina em mamíferos (mTORC1), que atua na manutenção da quiescência dos folículos primordiais (ADHIKARI *et al.*, 2010). O mTORC1 é uma serina/treonina quinase que pode atuar promovendo a ativação dos folículos primordiais, regulando assim o crescimento e a proliferação celular em vários tipos de células em resposta a fatores de crescimento e nutrientes. Ao mesmo tempo, a sobrevivência de folículos primordiais é mantida através da PI3K presente no citoplasma que vai atuar iniciando a produção de fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato - PIP3 a partir do PIP2, no entanto, o PTEN converte o PIP3 em PIP2. Em estudos recentes verificou-se que TSC e PTEN manipulam a ativação folicular através da regulação negativa da proteína ribossomal S6 - rpS6 (ADHIKARI *et al.*, 2009). Na ausência das moléculas que promovem a sobrevivência dos folículos primordiais, incluindo PDK1 e rpS6, todos os folículos primordiais são perdidos prematuramente a partir do seu estado quiescente (REDDY *et al.*, 2009a) (Figura 2).



**Figura 2.** Via de sinalização PI3K, mostrando as moléculas que mantêm a dormência dos folículos primordiais incluindo PTEN, FOXO3, p27 e o complexo TSC1/TSC2, e as que mantêm a sobrevivência de folículos primordiais, incluindo PI3K, PDK1, mTORC1, S6K1 e rpS6. Adaptado de REDDY *et al.*, 2009a.

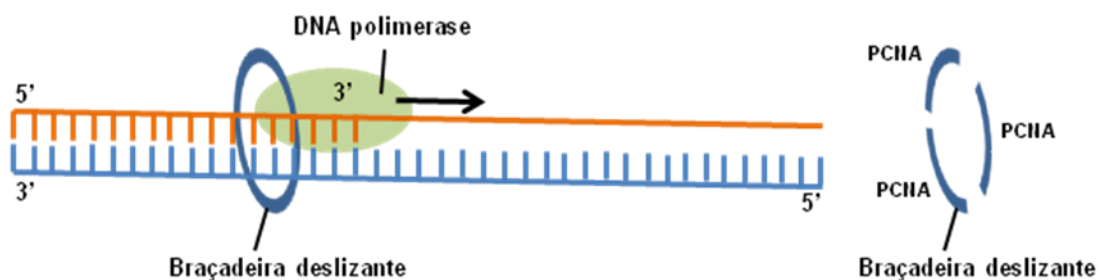
### 2.3. Crescimento de folículos primários e secundários

Com a ativação dos folículos primordiais, as células da pré-granulosa que circundam o oócito sofrem alterações morfológicas passando de pavimentosas a cúbicas. Estas, por sua vez, se multiplicam acompanhando o crescimento do oócito, dando origem ao folículo primário. Nesses folículos, as glicoproteínas que irão formar a zona pelúcida (Zona pelúcida 1 - ZP1, Zona pelúcida 2 - ZP2 e Zona pelúcida 3 - ZP3) (LEE *et al.*, 2000; RANKIN *et al.*, 2001) começam a ser sintetizadas, tornando-se claramente visíveis apenas em folículos secundários (MATOS *et al.*, 2004; FIGUEIREDO *et al.*, 2008). Em bovinos, o diâmetro dos folículos primários varia de 40 a 60  $\mu\text{m}$ , com o oócito medindo cerca de 30 a 40  $\mu\text{m}$  de diâmetro (BECKERS *et al.*, 1996). Embora a foliculogênese pré-antral não seja dependente de gonadotrofinas, os receptores para FSH (R-FSH) já são encontrados em folículos primários (OKTAY *et al.*, 1997).

Os fatores locais que agem no crescimento dos folículos primários para secundários são: GDF-9 (camundonga: DONG *et al.*, 1996, roedores: NILSSON & SKINNER, 2002, 2003; WANG & ROY, 2004, cabras: MARTINS *et al.*, 2008, mulheres: HREINSSON *et al.*, 2002), BMP-7 (ratas: LEE *et al.*, 2004), BMP-15 (ovelha: GALLOWAY *et al.*, 2000,

roedores: FORTUNE, 2003), Ativina (vacas: HULSHOF *et al.*, 1997, ratas: ZHAO *et al.*, 2001, camundongas: SMITZ *et al.*, 1998, cabras: SILVA *et al.*, 2006), EGF (vacas: GUTIERREZ *et al.*, 2000, roedores: ROMANO *et al.*, 1994, mulheres: ROY & KOLE, 1998, cabras: SILVA *et al.*, 2004), FGF-2 (vacas: NUTTINCK *et al.*, 1996), gatas: JEWGENOW, 1996), ratas: NILSSON *et al.*, 2001, FGFb (vaca: VERNON & SPICER, 1994), Fator de Crescimento Transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (camundonga: LIU *et al.*, 1999).

Com a contínua proliferação das células da granulosa, ocorre a formação do folículo secundário, caracterizado pela presença de duas ou mais camadas de células da granulosa de morfologia cúbica ao redor do oócito. Durante esta fase, ocorre uma intensa atividade mitótica nas células da granulosa, que é regulada por inúmeros fatores, dentre os quais pode-se destacar o Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA), uma proteína nuclear que atua como co-fator para a DNA polimerase e se expressa diferentemente de acordo com o ciclo celular. A sua taxa de síntese é diretamente proporcional à taxa de proliferação celular. Essa proteína constitui-se em um marcador de células em proliferação, sendo expressa durante a replicação do DNA, no início da fase G1, com expressão máxima na fase S e declínio na fase G2 (GAN *et al.*, 1995; WANDJI *et al.*, 1996). Sendo assim, um marcador operacional de proliferação celular marcando células tanto em proliferação como células em reparo (BACCHI & GOWN, 1993). A PCNA vai atuar quando três subunidades dessa proteína se ligam à braçadeira deslizante que está ligada à DNA polimerase durante a replicação do DNA (Figura 3).



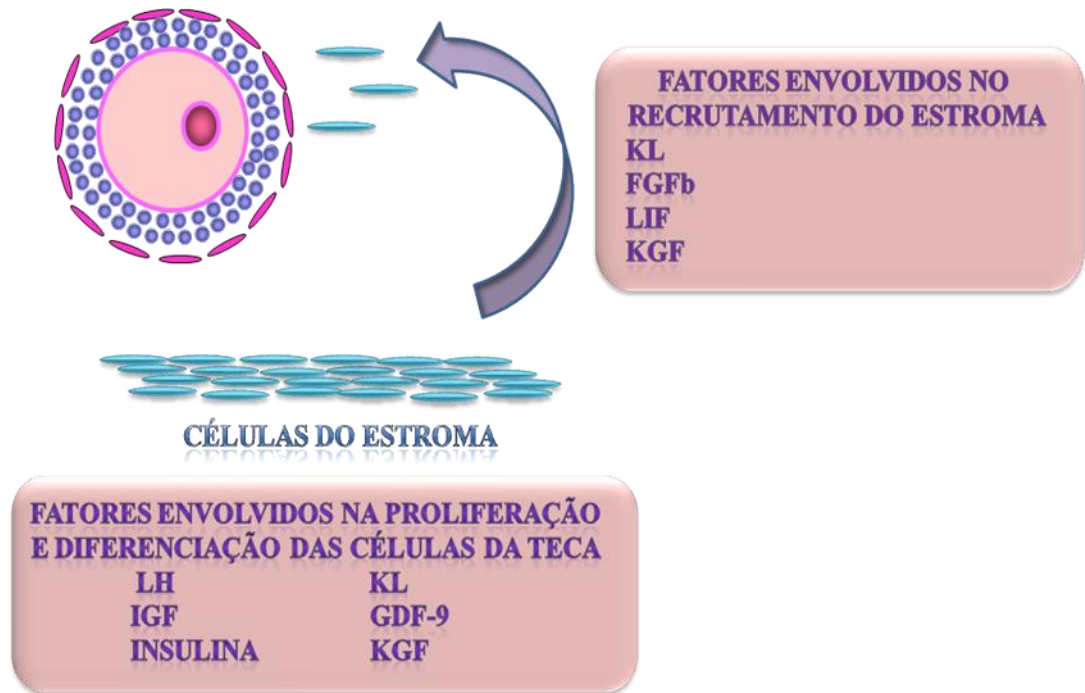
**Figura 3.** União das subunidades da PCNA com a braçadeira deslizante que está ligada com a DNA polimerase. Adaptada de De ROBERTIS, 2006.

Quando esses folículos apresentam quatro ou mais camadas de células da granulosa, ocorre o aparecimento das células da teca, aumentando a vascularização, possibilitando a atuação das gonadotrofinas nas células da granulosa e no oócito (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). As células da teca são originárias de células precursoras presentes no estroma

ovariano (HONDA *et al.*, 2007) e apresentam características estruturais de células secretoras de esteróides, incluindo mitocôndria com cristas vesiculares, retículo endoplasmático agranular e vesículas lipídicas (MAGOFFIN, 2005). A mitocôndria contém a primeira enzima na via esteroidogênica, a enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol através do citocromo P450 - CYP11A e o retículo endoplasmático contém o restante das enzimas necessárias para produzir os andrógenos, que são necessários para a produção de estradiol nas células da granulosa. A expressão do RNAm que codifica as enzimas esteroidogênicas foi observada em células da teca de folículos pré-antrais de bovinos, embora, em ovinos, a expressão da proteína reguladora aguda esteroidogênica (STAR) tenha sido bloqueada nessas células (BÁO & GARVERICK, 1998).

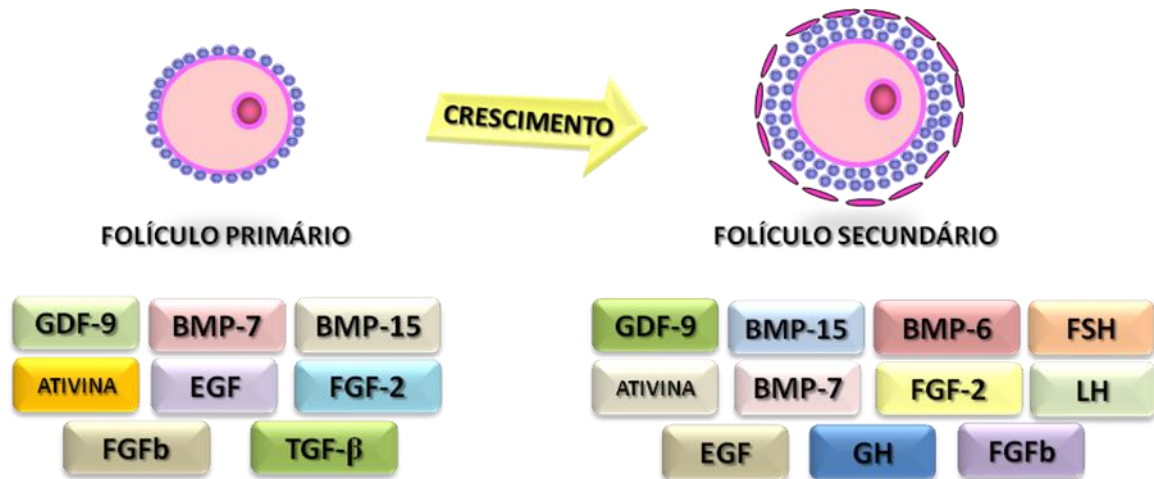
O desenvolvimento das células da teca ao redor do folículo aumenta progressivamente sua vascularização, que está sob influência direta do VEGF. Em estudos recentes foi demonstrado um aumento da expressão de VEGF em células da teca de folículos de roedores, bovinos e suínos à medida que esses folículos alcançam o estágio de ovulação (RAVINDRANATH *et al.*, 1992, REDMER *et al.*, 2001, TAYLOR *et al.*, 2004). Por outro lado, uma supressão de gonadotrofinas usando um antagonista de Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH) resulta na redução da proliferação de células tecais e endoteliais e baixa densidade vascular nos folículos antrais (TAYLOR *et al.*, 2004).

Evidências demonstram que os precursores das células da teca residem no estroma ovariano e são recrutados por fatores liberados de folículos após serem ativados. Com isso, alguns fatores podem ser responsáveis pelo recrutamento destas células, enquanto que outros podem promover a diferenciação e proliferação. Dentre esses fatores temos o KL (PARROT & SKINNER 1997), FGFb (NILSSON & SKINNER, 2004), Fator inibidor da leucemia - LIF (NILSSON & SKINNER *et al.*, 2002) e Fator de crescimento do keratinócito - KGF (PARROT *et al.*, 1994) que estão envolvidos no recrutamento do estroma, enquanto que o Hormônio luteinizante- LH e IGF (MAGOFFIN & WEITSMAN, 1994), Insulina (BARBIEREI *et al.*, 1984), KL (PARROT & SKINNER, 1997), GDF-9 (SPICER *et al.*, 2008) e KGF (PARROT *et al.*, 1994) estão envolvidos na proliferação e diferenciação das células da teca (Figura 4).



**Figura 4.** Fatores envolvidos no processo de recrutamento do estroma e proliferação/diferenciação das células da teca. Adaptado de YOUNG & McNEILLY, 2010.

Estudos recentes mostram que diversas citocinas e fatores de crescimento influenciam no crescimento de folículos secundários, entre eles pode-se destacar o GDF-9 (vacas: SPICER *et al.*, 2008, cabras: SILVA *et al.*, 2005, camundongas: HAYASHI *et al.*, 1999), BMP-15 (ovelhas: JUENGEL *et al.*, 2002), Ativina-A (vacas: McLAUGHLIN *et al.*, 2010, ratas: ZHAO *et al.*, 2001, ovelhas: THOMAS *et al.*, 2003), TGF-  $\beta$  (camundongas: LIU *et al.*, 1999), BMP-6 (vacas: GLISTER *et al.*, 2004, ovelhas: JUENGEL & McNATTY, 2005, cabras: SILVA *et al.*, 2006), BMP-7 (caprinos: ARAÚJO *et al.*, 2010), FGF-2 (caprinos: ALMEIDA *et al.*, 2012), EGF e IGF-1 (vacas: GUTIERREZ *et al.*, 2000), Hormônio do Crescimento - GH (ratas: LIU *et al.*, 1998) e FGFB (vacas: WANDJI *et al.*, 1996). Além dessas substâncias, gonadotrofinas como FSH em vacas (GUTIERREZ *et al.*, 2000) e porcas (MAO *et al.*, 2002) e LH em camundongas (WU *et al.*, 2000) também exercem esse efeito sobre os folículos secundários (Figura 5).



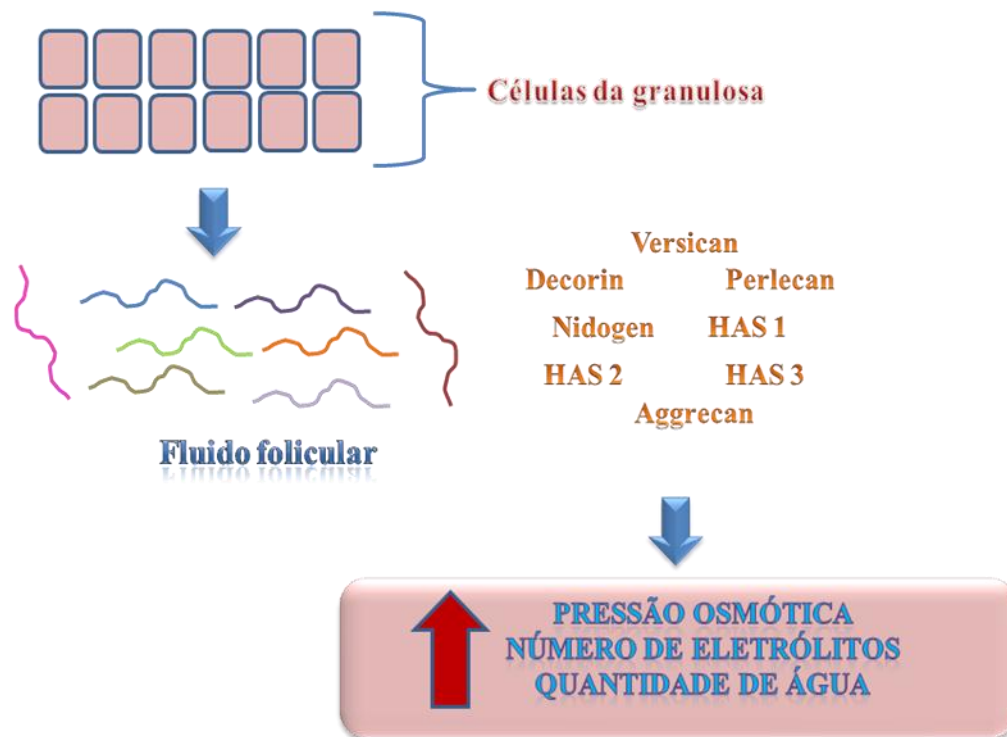
**Figura 5.** Fatores que influenciam o crescimento dos folículos primários e secundários.

#### 2.4. Crescimento dos folículos antrais (terciários e pré-ovulatórios)

Com o desenvolvimento dos folículos secundários e organização das células da granulosa em múltiplas camadas ocorre a formação de uma cavidade repleta de líquido denominada antro, que confere a classificação dos folículos terciários em antrais e posteriormente em pré-ovulatórios (BARNETT *et al.*, 2006). Com o desenvolvimento desses folículos, as células da granulosa são diferenciadas em células do cumulus (mais próximas ao oócito) e células murais (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). O fluido antral formado é um composto rico em substâncias reguladoras derivadas do sangue (gonadotrofinas) que flui através dos capilares da teca ou secreções das células foliculares, como por exemplo, esteróides, fatores de crescimento e proteoglicanos. A produção desse fluido é intensificada pelo aumento da vascularização folicular e permeabilidade dos vasos sanguíneos que ocorre com o desenvolvimento do folículo. A formação do líquido folicular ocorre em função da síntese de moléculas osmoticamente ativas oriundas das células da granulosa, como os glicosaminoglicanos, que atuam carregando líquido para o interior do folículo, formando assim o fluido folicular (Figura 6). Em estudos anteriores foi evidenciado que a bomba de sódio contribui para o aumento da pressão osmótica na cavidade antral do folículo pré-ovulatório (GOSDEN *et al.*, 1988). Dentre os proteoglicanos que atuam na formação do antro, os mais importantes são a Hialuronidase sintetase 1 e 2 (HAS 1 e 2), Versican e Perlecan. Com isso, podemos destacar o ácido hialurônico que é sintetizado por três enzimas (HAS 1, HAS 2 e HAS 3) presentes nas células da granulosa. Sabe-se que a HAS 2 pode ser induzida por



gonadotrofinas em células da granulosa de bovinos (SCHOENFELDER *et al.*, 2003). Alguns estudos mostram que o proteoglicano sulfato de condroitina é um importante regulador do potencial osmótico no fluido folicular (CLARKE *et al.*, 2006). Em relação às outras proteínas, foi identificado que o Versican também está presente no fluido folicular de bovinos (LEMIRE *et al.*, 2002, McARTHUR *et al.*, 2000, ERIKSEN *et al.*, 1999). Essa proteína parece ser regulada por gonadotrofinas em células da granulosa de ratas (YANAGISHITA *et al.*, 1981). Outras proteínas como Perlecan (McARTHUR *et al.*, 2000) e seus RNAm (PRINCIVALLE *et al.*, 2001, IRVING-RODGERS *et al.*, 2004) foram detectadas em células da granulosa de folículos pré-antrais (McARTHUR *et al.*, 2000) e antrais bovinos (McARTHUR *et al.*, 2000, IRVING-RODGERS *et al.*, 2004).



**Figura 6.** Formação do fluido folicular decorrente da produção de proteoglicanos pelas células da granulosa. Adaptado de RODGERS & IRVING-RODGERS, 2010.

Com a progressão do desenvolvimento, os folículos antrais tornam-se dependentes de FSH. Com isso, o desenvolvimento desses folículos pode ser subdividido nas fases de crescimento, recrutamento, seleção e dominância (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). O recrutamento de um grupo de folículos antrais e a seleção de um folículo dominante são as principais características desta fase, e nas espécies monovulatórias, como a bovina, somente um folículo será ovulado (BAERWALD *et al.*, 2003).

## 2.5. Atresia folicular

A foliculogênese ovariana é um processo biológico complexo que envolve diferentes tipos celulares e suas interações (BONNET *et al.*, 2008) e tem uma duração estimada de 6 meses na espécie humana (GOUGEON *et al.*, 2000). Dos milhares de folículos presentes nos ovários bovinos ao nascimento, os folículos pré-antrais representam 90% da população folicular, sendo que 95% deste total é constituído por folículos primordiais (SAUMANDE, 1991). Todavia, apesar da grande população folicular, cerca de 99,9% não atingem a ovulação, pois morrem por um processo natural denominado atresia. Esse processo possui a capacidade de reduzir significativamente o número de oócitos que seriam ovulados, diminuindo assim o potencial reprodutivo das fêmeas.

A atresia pode ocorrer por via degenerativa e/ou apoptótica (FIGUEIREDO *et al.*, 2008). A via degenerativa da atresia inicia-se com uma redução da oxigenação celular durante a isquemia resultando em uma diminuição da produção de ATP, afetando o funcionamento da bomba de sódio e potássio presente na membrana celular. Isso resulta no aumento de íons sódio ( $\text{Na}^+$ ), acúmulo de íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), aumento do volume de água intracelular, agregação da cromatina, vacuolização citoplasmática, perda da integridade da membrana plasmática e consequente ruptura celular. Além da isquemia, outros fatores que podem levar a degeneração são estímulos tóxicos, degenerativos e imunológicos. Com a evolução da degeneração, a morte celular é identificada histologicamente como necrose (PADANILAM *et al.*, 2003; BARROS *et al.*, 2001). Durante a necrose, o conteúdo celular é liberado, causando dano às células vizinhas e uma reação inflamatória no local.

A apoptose ou morte celular programada pode ser reconhecida por algumas características morfológicas e bioquímicas como a retração da célula que causa perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas, as mitocôndrias podem apresentar ruptura da membrana externa e a cromatina sofre condensação (ZIEGLER & GROSCURTH, 2004). Outra característica marcante da apoptose é a fragmentação internucleossômica do DNA e formação de “corpos apoptóticos” (SARASTE & PULKKI, 2000). A apoptose é um fenômeno pelo qual os folículos que não são selecionados para ovular são eliminados. Esse processo é altamente dependente da expressão de genes (BARNETT *et al.*, 2006). O balanço estabelecido entre os genes pró-apoptóticos e anti-apoptóticos pode determinar a apoptose (HUSSEIN *et al.*, 2005). Além disso, os inibidores de proteínas de apoptose (IAPs) estão envolvidos na sobrevivência de folículos (KUGU *et al.*, 1998; LIU *et al.*, 1998; SLOT *et al.*, 2006; FUJINO *et al.*, 2008).

A progressão da apoptose pode ser dividida nas fases de iniciação, execução e terminação. A fase de iniciação pode ser promovida por fatores que irão ativar a via extrínseca, tais como citocinas (ex. Fator de Necrose tumoral- $\alpha$ , Fas ligand) e proteínas virais ou pela remoção de fatores de crescimento. Essa fase de execução também pode ser induzida por fatores que irão ativar a via intrínseca, tais como a irradiação ou o estresse oxidativo. Independentemente dos tipos de via, ocorre o envolvimento de uma ou mais caspases de iniciação, conhecidas como caspase 8 e caspase 9 (MORITA & TILLY, 1999; JOHNSON & BRIDGHAM, 2002). A fase de execução é caracterizada por mudanças na membrana celular, fragmentação nuclear, condensação da cromatina e degradação do DNA. Esta fase é considerada irreversível e ocorre devido à ativação das caspases efetoras (caspase 3, caspase 6 e caspase 7). Finalmente, a fase de terminação consiste na fagocitose de corpos apoptóticos fragmentados através de um processo não inflamatório (JOHNSON, 2003).

Para evitar a grande perda folicular que ocorre naturalmente *in vivo* pelas vias (apoptótica e/ou necrótica), vem sendo desenvolvidos sistemas de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos, especialmente para folículos pré-antrais, visando aumentar o potencial reprodutivo das fêmeas.

## **2.6. Sistemas de cultivo e técnicas de avaliação do desenvolvimento folicular *in vitro***

### **2.6.1. Sistemas de cultivo *in vitro***

Para o desenvolvimento de um sistema de cultivo de folículos pré-antrais eficaz, é essencial que ocorra um controle de variáveis que possam afetar direta ou indiretamente o ambiente, tais como, temperatura, CO<sub>2</sub>, oxigênio, controle das contaminações fúngicas e bacterianas e fatores que estão presentes no meio de cultivo como vitaminas, substratos energéticos, a presença de sais inorgânicos, aminoácidos, dentre outras substâncias (SILVA *et al.*, 2004, 2005; TELFER, 2001).

Diferentes sistemas de cultivo têm sido desenvolvidos para manter a viabilidade e promover o crescimento de folículos pré-antrais *in vitro* (VAN DEN HURK *et al.*, 2000). Nesses sistemas, os folículos ovarianos podem ser cultivados dentro do próprio tecido ovariano (cultivo *in situ*) ou na forma isolada. Em roedores, devido à pequena dimensão da gônada feminina, os ovários são cultivados por inteiro no meio (FORTUNE, 2003). Por outro lado, em animais domésticos de médio e grande porte, devido às grandes dimensões dos ovários, alguns autores têm realizado o cultivo de pequenos fragmentos de córtex ovariano,

rico em folículos primordiais, com o objetivo de estudar a ativação folicular e o posterior crescimento de folículos primários (bovinos: BRAW-TAL & YOSSEFI, 1997; humanos: ZHANG *et al.*, 2004; caprinos: MARTINS *et al.*, 2008). Apesar do cultivo *in situ* proporcionar a manutenção da integridade tridimensional dos folículos e a interação destes com as células do estroma, o cultivo de folículos pré-antrais isolados permite o estudo dos efeitos *in vitro* de hormônios e fatores de crescimento sobre os folículos secundários (FORTUNE, 2003). Esse procedimento mecânico é uma técnica de microdissecção, que permite o isolamento de grandes folículos pré-antrais (~200µm) do estroma ovariano com o auxílio de agulhas. Esta técnica possibilita a manutenção da integridade das camadas tecais presentes em grandes folículos pré-antrais (TELFER, 1998).

O resultado mais satisfatório relacionado ao cultivo de folículos pré-antrais foi obtido por O'BRIEN *et al.*, 2003 em camundongas, que utilizou um sistema de cultivo em dois passos (iniciando com o cultivo de folículos primordiais *in situ* até a formação dos secundários, que foram isolados e cultivados até a maturação), os quais mostraram que é possível obter crias viáveis a partir do cultivo de oócitos oriundos de folículos primordiais. Em ruminantes, o cultivo de folículos secundários já proporcionou avanços significativos como a produção de embriões (bubalinos: GUPTA *et al.*, 2008, caprinos: SARAIVA *et al.*, 2010; MAGALHÃES *et al.*, 2011a; ovinos: ARUNAKUMARI *et al.*, 2010). No entanto, em bovinos, espécie de maior importância econômica, os avanços obtidos com cultivo de folículos secundários são limitados apenas à formação de antro (GUTIERREZ *et al.*, 2000). A partir disso, observou-se uma grande necessidade de aprofundar os estudos relacionados à influência de importantes substâncias reguladoras da foliculogênese, como o FSH e o GDF-9 no desenvolvimento folicular bovino.

#### 2.6.2. Técnicas de avaliação do desenvolvimento folicular *in vitro*

Durante o crescimento folicular *in vitro* as técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase - PCR em tempo real e Microscopia de fluorescência são frequentemente utilizadas para avaliar expressão gênica e viabilidade folicular, respectivamente.

O estudo da expressão gênica, que envolve a análise de RNAm para diversas substâncias (ligantes e seus receptores) auxilia a compreensão do papel de hormônios e fatores de crescimento em cada fase do desenvolvimento folicular. A técnica de PCR em tempo real apresenta como principal importância determinar de forma rápida e exata as mudanças de expressão gênica resultantes de fenômenos patológicos ou fisiológicos. Assim, o

uso da PCR em tempo real possibilita correlacionar a fisiologia com os eventos moleculares e assim compreender melhor os processos biológicos (LEJONA *et al.*, 2006). A normalização dos dados obtidos é realizada por meio da utilização de genes de referência. De acordo com critérios geralmente aceitáveis, um gene de referência adequado é um gene que não apresente variação na sua expressão em todas as amostras investigadas (ANDERSEN *et al.*, 2004). Em folículos pré-antrais bovinos, os genes de referência que se mostram mais adequados como controle endógeno para a normalização das quantidades de mRNA durante análises de PCR em tempo real são o Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase (GAPDH) e Ubiquitina (UBQ) (REBOUÇAS *et al.*, 2011).

Uma técnica bastante empregada para avaliar a viabilidade folicular após o cultivo *in vitro* é a microscopia de fluorescência, a qual utiliza marcadores fluorescentes, que quando excitados com radiação de baixo comprimento de onda, absorvem energia e emitem luz de comprimento de onda maior (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005). Em vários estudos, a técnica de fluorescência vem sendo utilizada para avaliar a viabilidade folicular após o cultivo *in vitro* (ROSSETTO *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2010; MAGALHÃES *et al.*, 2009a). Nesses trabalhos, os folículos foram analisados por fluorescência com base na detecção simultânea de células vivas e mortas marcadas por calceína-AM e pelo etídio homodímero-1, respectivamente. Enquanto a primeira sonda detecta atividade da esterase intracelular, enzima característica de células viáveis, a outra marca ácidos nucleicos em células não viáveis, com ruptura na membrana plasmática (LOPES *et al.*, 2009).

## **2.7. Importância do hormônio folículo estimulante (FSH) no controle da foliculogênese *in vitro***

O FSH desempenha um papel fundamental na regulação das funções gonadais, sendo produzido e secretado pela glândula hipófise como uma glicoproteína de elevada heterogeneidade (ULLOA-AGUIRRE *et al.*, 1995). As ações do FSH são mediadas nas células somáticas ovarianas através de receptores-específicos presentes na superfície das células da granulosa (MINJ *et al.*, 2008). A ligação do FSH ao seu receptor resulta em uma variedade de reações, tais como a estimulação da proliferação celular e síntese de esteróides. O RNAm para os R-FSH foi encontrado em folículos primários e secundários bovinos (WANDJI *et al.*, 1992) e caprinos (SARAIVA *et al.*, 2011). Em folículos secundários, ocorre um aumento na quantidade de receptores para FSH em células da granulosa (SENEDA & BORDIGNON, 2007).

Embora os efeitos das gonadotrofinas sejam mais pronunciados sobre a foliculogênese antral, já foi demonstrado que o FSH estimulou a ativação e o crescimento de folículos primordiais caprinos cultivados *in vitro* (MATOS *et al.*, 2007). Além disso, durante o cultivo de pequenos folículos pré-antrais (30-70  $\mu\text{m}$ ) bovinos, o FSH promoveu um aumento do diâmetro folicular (HULSHOF *et al.*, 1995). Após seis dias de cultivo na presença de FSH, folículos primários e secundários (60-179  $\mu\text{m}$ ), isolados enzimaticamente de ovários de fetos bovinos, aumentaram o diâmetro, a sobrevivência folicular, bem como a secreção de progesterona e estradiol (WANDJI *et al.*, 1996).

Vários estudos *in vitro* têm mostrado que o FSH pode promover a formação de antro a partir do cultivo de folículos secundários avançados (camundongas: SPEARS *et al.*, 1998; vacas: GUTIERREZ *et al.*, 2000; cabras: ZHOU & ZHANG, 2005; ovelhas: CECCONI *et al.*, 1999; porcas: MAO *et al.*, 2002). Embora os receptores de FSH não estejam presentes em folículos primordiais, o FSH parece exercer um efeito indireto sobre o desenvolvimento folicular inicial através da liberação de fatores parácrinos produzidos por folículos maiores ou pelas células do estroma ovariano (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). No entanto, folículos secundários isolados de ovários de cabra adquirem antro quando cultivados em meio sem adição de FSH, mostrando que este hormônio não é determinante para a formação de antro e crescimento de folículos nesta fase (SARAIVA *et al.*, 2011).

O FSH também é importante para a manutenção da morfologia dos folículos pré-antrais caprinos após 7 dias de cultivo (MATOS *et al.*, 2007). Do mesmo modo, estudos têm mostrado que o sucesso desses sistemas de cultivo *in vitro* na presença de FSH é influenciado por fatores, como a origem desta gonadotrofina (MAGALHÃES *et al.*, 2009a) e o cultivo em meio sequencial (SARAIVA *et al.*, 2011). Em estudos recentes foi demonstrado que a adição de FSH sequencial (Dias 0 – 6: 100ng/mL, Dias 7 – 12: 500ng/mL) ao meio de cultivo mantém a sobrevivência de folículos pré-antrais isolados e promove aumento da taxa de crescimento folicular e formação de antro em cabras (ALMEIDA *et al.*, 2011) e cadelas (SERAFIM *et al.*, 2010). Além dos efeitos diretos, estudos demonstraram que o FSH regula a expressão de vários fatores de crescimento, tais como KL, BMP-15 e GDF-9, que têm um papel importante na ativação e no posterior crescimento folicular (JOYCE *et al.*, 1999, THOMAS *et al.*, 2005), desempenhando com isso, um papel indireto no desenvolvimento folicular inicial.

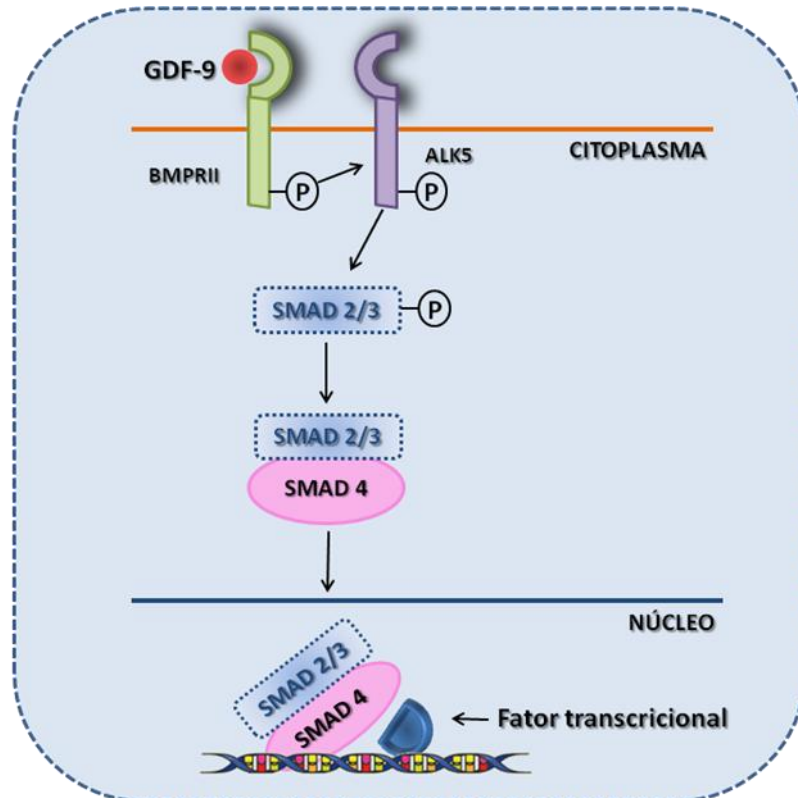
## 2.8. Importância do Fator de Crescimento e Diferenciação-9 (GDF-9) no controle da foliculogênese

### 2.8.1. Fator de Crescimento e Diferenciação – 9 (GDF-9)

O GDF-9 é um fator de crescimento membro da superfamília de fatores de Crescimento Transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), conhecidos por serem importantes reguladores da proliferação e diferenciação de vários tipos de células (TEN DIJKE *et al.*, 2000). O GDF-9, é uma proteína homodimérica secretada pelo oócito (CHANG *et al.*, 2002) que foi isolada e caracterizada primeiramente pela PCR, a partir de DNA genômico de rato (McPHERRON & LEE, 1993). Esta proteína já foi descrita como uma importante reguladora do desenvolvimento folicular no ovário mamífero (ORISAKA *et al.*, 2006).

O GDF-9 funciona como um dímero ligado não covalentemente, o qual pode se associar com o seu próximo parálogo, proteína morfogenética óssea (BMP-15/GDF-9B) (VITT *et al.*, 2002). Uma característica diferente normalmente encontrada nos membros da superfamília TGF- $\beta$  é a presença de sete cisteínas conservadas. Embora apenas seis destas cisteínas participem da estrutura tridimensional da molécula. A sétima cisteína é responsável pela formação de pontes dissulfeto intermoleculares entre os monômeros dos membros da superfamília TGF- $\beta$  (XIAO *et al.*, 2007). Entretanto, o GDF-9 de diferentes espécies não contém esse sétimo resíduo de cisteína (McPHERRON & LEE, 1993, JAATINEN *et al.*, 1999; HALM *et al.*, 2008). Em adição, essa proteína tem vários sítios de glicosilação conservados (DUBE *et al.*, 1998; McPHERRON & LEE, 1993).

Na célula, o GDF-9 exerce seus efeitos através da ligação ao complexo de receptores serina-treonina quinase do tipo II (Receptor de BMP do tipo II-BMPRII) que em seguida recrutam os receptores do tipo I (Receptor de ativina ligada a kinase 5-ALK5), e após a sua fosforilação, ativam proteínas transdutoras de sinais citoplasmáticas da família SMAD (MAZERBOURG *et al.*, 2004) através da ativação da via PI3K/Akt (ORISAKA *et al.*, 2006). Esse fator leva à fosforilação específica de SMAD-2 e essa proteína transloca-se para o núcleo onde atua regulando ou inibindo a transcrição de genes (HATA *et al.*, 1998) (Figura 7).



**Figura 7.** Via de sinalização celular do GDF-9, seus receptores do tipo I e II (ALK-5 e BMPRII) e os mensageiros intracelulares (SMADS 2, 3 e 4). Adaptado de SPICER *et al.*, 2008.

### 2.8.2. Efeitos do GDF-9 na foliculogênese pré-antral

Em modelos de camundongos knockout, a falta do gene GDF-9 funcional causa infertilidade através do bloqueio da foliculogênese no estágio de folículos primários, ausência de formação de células da teca e defeitos na competência meiótica do oócito, indicando que esse fator está associado com o desenvolvimento folicular inicial (DONG *et al.*, 1996). A deleção do gene GDF-9 por recombinação homóloga em camundongas bloqueou a foliculogênese no estágio primário e a proliferação de células da granulosa cubóides não ocorreu (ELVIN *et al.*, 1999b).

A expressão do RNAm para GDF-9 foi demonstrada inicialmente no oócito de folículos em diversas espécies (roedores: HAYASHI *et al.*, 1999; humanos: AALTONEN *et al.*, 1999; ovinos: JUENGEL *et al.*, 2002; bovinos: PENNETIER *et al.*, 2004; caprinos: SILVA *et al.*, 2005). A sua expressão em oócitos de folículos primordiais de ovelhas e cabras levantou a possibilidade de que o GDF-9 é essencial para a ativação de folículos primordiais e o seu subsequente desenvolvimento (SILVA *et al.*, 2005). A expressão do RNAm em oócitos



de folículos primordiais de hamster levantou a possibilidade de que o GDF-9 é essencial para a diferenciação de células somáticas em células da pré-granulosa (WANG & ROY, 2006). O GDF-9 media a supressão dos genes em oócitos de folículos primordiais (LAN *et al.*, 2004), e em contraste, camundongas deficientes para GDF-9, não apresentam o gene PTEN (REDDY *et al.*, 2008).

A injeção de GDF-9 recombinante em células da granulosa resultou no aumento do número de folículos primários e diminuição do *pool* de folículos primordiais, demonstrando que este fator de crescimento pode estar envolvido no recrutamento do folículo primordial em ratas (VITT *et al.*, 2000b) e atua aumentando o crescimento e diferenciação de folículos primários e secundários em roedores (HAYASHI *et al.*, 1999). Em ratas, o GDF-9 (50 ng/mL) atua promovendo o crescimento de folículos primários (NILSSON & SKINNER, 2002). Com isso, o GDF-9 estimula a manutenção da viabilidade folicular e a proliferação de células da granulosa do estágio primário para secundário após 7 dias de cultivo (HREINSSON *et al.*, 2002).

Em estudos *in vitro*, observou-se que o GDF-9 promove o crescimento do oócito, proliferação de células da granulosa e diferenciação das células da teca em humanos (SADEU e SMITZ, 2008). Em bovinos, o GDF-9 estimula a proliferação de células da granulosa (SPICER *et al.*, 2006) e de células da teca (SPICER *et al.*, 2008) de pequenos (3-6 mm) e grandes (8-22 mm) folículos antrais. Nessa mesma espécie, a utilização de GDF-9 aumenta a formação de blastocistos (HUSSEIN *et al.*, 2005). Na concentração de 200 ng/mL, o GDF-9 exerce efeito sinérgico com o FSH sobre o crescimento e diferenciação de folículos pré-antrais murinos (HAYASHI *et al.*, 1999) e estimula a manutenção da viabilidade folicular e da proliferação de células da granulosa em humanos (HREINSSON *et al.*, 2002). Recentemente, foi demonstrado que a adição de 200 ng/ml de GDF-9 ao meio de cultivo resulta na manutenção da sobrevivência folicular, no crescimento e no aumento do percentual de folículos secundários caprinos, mantendo ainda sua integridade ultraestrutural (MARTINS *et al.*, 2008). O GDF-9 suprime ainda a apoptose de células da granulosa através da ativação da via PI3K/Akt, controlando a atresia do folículo ovariano durante o estágio pré-antral para antral inicial (ORISAKA *et al.*, 2006). Neste caso, os folículos apresentam células da granulosa anormais e não adquirem uma camada da teca, indicando que este fator exerce uma ação parácrina sobre as células somáticas circundantes (DONG *et al.*, 1996). Em ratas, ORISAKA *et al.*, 2006 verificaram que a adição de 100 ng/ml de GDF-9 promove a viabilidade e o crescimento folicular durante a transição da fase pré-antral para fase antral inicial.

### 2.8.3. Efeitos do GDF-9 na foliculogênese antral

Durante o cultivo de células da granulosa isoladas de grandes folículos antrais de camundongas, o GDF-9 induziu a expressão de Gremlin (PANGAS *et al.*, 2004), um antagonista das BMPs (HSU *et al.*, 1998). O GDF-9 promove a proliferação de células da granulosa, suprime a expressão do receptor de LH/CG (R-LHCG) em células da granulosa e estimula a expressão de genes nas células do cumulus, como a HAS 2 e a Cicloxigenase 2 (COX2), que são necessários para a expansão do complexo cúmulus-oócito e ovulação (ELVIN *et al.*, 1999a, 2000, FÜLOP *et al.*, 1997). O tratamento com GDF-9 regula várias enzimas presentes nas células da granulosa, como a STAR, envolvidas na expansão do cumulus, na manutenção de um microambiente ideal de oócitos, sendo essencial para a ovulação normal, fertilização e reprodução feminina (ELVIN *et al.*, 1999a).

O GDF-9 exerce efeitos sobre a incorporação de timidina em células da granulosa ou da teca de folículos antrais de ratas, mostrando um efeito estimulador deste fator sobre a proliferação celular (VITT *et al.*, 2000a). Em bovinos, o GDF-9 estimula a proliferação e inibe a produção de estradiol e de progesterona em células da granulosa de pequenos (3–6 mm) e grandes folículos antrais (8–22 mm) (SPICER *et al.*, 2006). Em alguns primatas, o RNAm para GDF-9 e sua proteína foram localizados em células da granulosa de folículos peri-ovulatórios (DUFFY, 2003). Em camundongas, a produção de androstenediona aumentou quando adicionou GDF-9 ao cultivo (SOLOVYEVA *et al.*, 2000). Em bovinos, o GDF-9 estimula a proliferação das células da granulosa e inibe a produção de progesterona e androstenediona em células da teca de pequenos folículos, onde os efeitos inibitórios de GDF-9 sobre a biossíntese de andrógenos estão associados com diminuições nos níveis de RNAm para R-LH e para a CYP11A1 (SPICER *et al.*, 2008). Já no cultivo com células da granulosa, o tratamento com GDF-9 sozinho aumenta a produção de progesterona em ratas (VITT *et al.*, 2000b).

### 3. PROBLEMA E HIPÓTESES

Conforme mostrado na revisão de literatura, a folículo gênese é um processo complexo regulado por diferentes hormônios e fatores de crescimento. Especialmente relacionado ao FSH e ao GDF-9 levantou-se os seguintes questionamentos: (1) Será que GDF-9 associado ou não com FSH estimula o crescimento folicular, a formação de antro e mantém a viabilidade em folículos secundários bovinos cultivados *in vitro*? e (2) Será que o GDF-9 e o FSH estimulam a expressão de RNAm para o PCNA e para as proteínas presentes no fluido folicular após o cultivo de folículos pré-antrais?

Diante da problemática estabelecida, foram formuladas as seguintes hipóteses: (1) O GDF-9 associado ou não ao FSH estimula o crescimento folicular, a formação de antro e mantém a viabilidade de folículos secundários bovinos isolados após o cultivo *in vitro* de 12 dias; e (2) o GDF-9 e o FSH sozinhos ou em combinação promovem o crescimento folicular e a proliferação das células da granulosa, aumentando assim os níveis de RNAm para o PCNA e para as proteínas que auxiliam a formação do fluido antral.

#### 4. JUSTIFICATIVA

O estudo da foliculogênese em vacas é de grande importância, tendo em vista que o Brasil é um dos maiores produtores de carne bovina do mundo (~ 190 milhões de animais) o que representa cerca de 1,8% do PIB nacional. Quando se considera que ovário bovino contém milhares de folículos pré-antrais (~300.000) e que é possível isolar cerca de 70.000 oócitos inclusos em folículos pré-antrais de um ovário bovino (De BEM *et al.*, 1997), pode-se vislumbrar a produção de milhares de embriões a partir de um único ovário. Para isto, torna-se necessário desenvolver sistemas de cultivo *in vitro* que possibilitem o crescimento de milhares folículos pré-antrais até estarem aptos à maturação *in vitro* e compreender os mecanismos que regulam a dinâmica folicular *in vitro*. Apesar da enorme quantidade de informações produzidas durante as duas últimas décadas, o entendimento completo dos mecanismos controladores do desenvolvimento folicular ainda não foi alcançado. Enquanto em roedores já foram obtidas crias saudáveis a partir do cultivo *in vitro* de folículos primordiais (O'BRIEN *et al.*, 2003), e em búfalos (GUPTA *et al.*, 2008), ovinos (ARUNAKUMARI *et al.*, 2010) e caprinos (SARAIVA *et al.*, 2010) já foram obtidos embriões a partir de oócitos provenientes de folículos secundários. Em bovinos, espécie de grande importância econômica, os resultados são limitados apenas à formação de antro (McLAUGHLIN *et al.*, 2010).

Na tentativa de desenvolver um sistema ideal para o crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais, diversas substâncias e fatores intraovarianos vêm sendo testados por equipes do mundo todo. Atualmente sabe-se que o FSH é o regulador primário da função ovariana e promove o crescimento folicular e a formação de antro em folículos pré-antrais cultivados *in vitro* em diferentes espécies. Embora o papel das gonadotrofinas sobre o desenvolvimento folicular venha sendo amplamente estudado há mais de duas décadas, sua associação aos fatores de crescimento produzidos localmente no ovário se tornou hoje, uma prioridade. Dentre estes fatores destaca-se o GDF-9, que possui um efeito positivo sobre a sobrevivência e viabilidade folicular, bem como na proliferação das células da granulosa e ainda pode atuar sinergicamente com o FSH sobre o crescimento e diferenciação dos folículos pré-antrais em humanos (HREINSSON *et al.*, 2002). Este fundamento aliado à escassez de estudos sobre o efeito destas substâncias na foliculogênese bovina deixou clara a necessidade de estudar a influência do FSH e GDF-9 sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais bovinos isolados.

Para compreender os mecanismos pelos quais FSH e GDF-9 promovem o desenvolvimento folicular é de grande importância a quantificação dos RNAm para o PCNA e para os proteoglicanos (HAS 1, HAS 2, Versican e Perlecan), que estão, respectivamente, envolvidos na formação do fluido folicular e na multiplicação das células da granulosa. Além disso, para melhor avaliar a eficiência dos meios de cultivo testados é de fundamental importância o emprego da técnica de microscopia de fluorescência a fim de determinar a viabilidade dos folículos pré-antrais bovinos cultivados *in vitro* e, deste modo, melhor avaliar a eficiência dos meios e sistema de cultivo testados.

## **5. OBJETIVOS**

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivos:

### **5.1. OBJETIVOS GERAIS**

- 1) Avaliar o efeito do FSH e GDF-9 sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos secundários bovinos;
- 2) Avaliar o efeito do FSH e do GDF-9 sobre a expressão do RNAm para o PCNA e para as proteínas (HAS 1, HAS 2, Versican e Perlecan) que estão envolvidas na formação do fluido folicular.

### **5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Determinar o efeito do FSH e GDF-9 sozinhos ou em associação, sobre a viabilidade, o crescimento e a formação de antro de folículos secundários bovinos cultivados *in vitro* por 12 dias;
- 2) Investigar a influência do FSH e GDF-9 sozinhos ou em associação, sobre os níveis de expressão de RNAm para PCNA, HAS 1, HAS 2, Versican e Perlecan através da quantificação por RT-PCR em tempo real.

**6. ARTIGO I**

**Efeitos do GDF-9 e do FSH no desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais bovinos**

(Effects of GDF-9 and FSH on the *in vitro* development of bovine preantral follicles)

Artigo em fase de submissão

## Effects of GDF-9 and FSH on the *in vitro* development of bovine preantral follicles

G. L. Vasconcelos<sup>A</sup>, M. V. A. Saraiva<sup>A, D</sup>, J. J. N. Costa<sup>A</sup>, M. J. Passos<sup>A</sup>, A. W. B. Silva<sup>A</sup>, R. D. Rossi<sup>A</sup>, A. M. L. R. Portela<sup>A</sup>, A. B. G. Duarte<sup>C</sup>, D. M. M. Padilha<sup>C</sup>, C.C. Campelo<sup>C</sup>, J. R. Figueiredo<sup>C</sup>, R. van den Hurk<sup>B</sup> and J. R. V. Silva<sup>A</sup>

<sup>A</sup>Biotechnology Nucleus of Sobral – NUBIS, Federal University of Ceara, CEP 62042-280, Sobral, CE, Brazil.

<sup>B</sup>Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, PO Box 80.163, Utrecht, The Netherlands.

<sup>C</sup>LAMOFOPA, Faculty of Veterinary Medicine, State University of Ceara, CEP 60740-000, Fortaleza, CE, Brazil.

<sup>D</sup>Corresponding author. Email: vivi\_veterianaria@yahoo.com.br

### Abstract

The aim of this study was to determine the role of GDF-9 alone or in combination with FSH on growth, viability and on the mRNA expression of PCNA, HAS 1, HAS 2, Versican and Perlecan in bovine secondary follicles cultured *in vitro*. Bovine secondary follicles (~0.2 mm) were isolated and cultured for 12 days in MEM<sup>+</sup> alone (control) or supplemented with GDF-9 (200 ng/mL), FSH (D0-D6: 100 ng/mL and D7-D12: 500 ng/mL) or both. Follicle survival and growth, as well as antrum formation and mRNA expression for the cited factors were evaluated. The results show that after 6 days of culture, FSH alone or associated with GDF-9 increased follicular diameter in relation to control medium. Moreover, after 12 days of culture, FSH promoted an increase in follicular diameter, while the association of FSH with GDF-9 significantly reduced follicular diameter when compared with follicles cultured in



MEM plus FSH. Furthermore, FSH or GDF-9 increased the antrum formation after 12 days of culture ( $P < 0.05$ ). Despite GDF-9 had significantly reduced the levels of mRNA for HAS 1 when compared to MEM, it has increased the levels of versican and perlecan. In addition, the presence of both FSH and GDF-9 increased mRNA levels for HAS 2, but reduced level those for PCNA. In conclusion, FSH and/or GDF-9 promotes the follicular growth and antrum formation, and GDF-9 stimulates the expression of versican and perlecan and interact positively with FSH to the increased expression of HAS 2.

**Keywords:** bovine, culture, follicles, GDF-9, FSH, mRNA

## 1. Introduction

Reproductive biotechniques used for *in vitro* embryo production depend on fertilizable oocytes, and the use these oocytes from preantral follicles could offer significant new ways for the propagation of valuable animal stocks (HAIDARI *et al.*, 2008). However, during female reproductive life span, the vast majority of these follicles (99.9%) become atretic toward ovulation (SKINNER, 2005). In this context, the development of *in vitro* culture system capable of promoting the growth and development of preantral follicles from mammalian ovaries should be established. This efficient system could be employed for the treatment of infertility in humans, avoiding intensive ovarian stimulations, as well as in domestic animals in order to maximize the reproductive potential of genetically valuable individuals (DEMEESTERE *et al.*, 2003; HAIDARI *et al.*, 2008). Several authors have cultured secondary follicles (~0.2 mm) up to antral follicles (bovine: GUTIERREZ *et al.*, 2000; ITOH *et al.*, 2002; ovine: ARUNAKUMARI *et al.*, 2010; caprine: MAGALHÃES *et al.*, 2011b; SARAIVA *et al.*, 2011) using different growth factors and hormones.

Growth and differentiation factor-9 (GDF-9) is a member of the superfamily of transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), known to be important regulators of proliferation and differentiation of various cell types (TEN DIJKE *et al.*, 2000). The activity of GDF-9 is mediated by the formation of a heterodimeric complex and its type I, Activin Receptor-like Kinase Type 5 (ALK-5) (MAZERBOURG *et al.*, 2004) and II (BMPRII) receptors (VITT *et al.*, 2002). The mRNA expression of GDF-9 was initially demonstrated in the oocyte of follicles in several species (rodents: HAYASHI *et al.*, 1999; human: AALTONEN *et al.*, 1999; sheep: JUENGEL *et al.*, 2002; cattle: PENNETIER *et al.*, 2004; goats: SILVA *et al.*, 2005). This growth factor has a stimulatory effect on cell proliferation, increasing so the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in human (KEDEM *et al.*, 2011). In cattle, the GDF-9 stimulates proliferation of granulosa cells (SPICER *et al.*, 2006) and theca cells (SPICER *et al.*, 2008) of small (3-6 mm) and large (8-22 mm) follicles. Recently, it was found that the addition of 200 ng/mL GDF-9 to culture medium for 7 days maintained the follicular viability and ultrastructure, and provides the growth of caprine preantral follicles enclosed in ovarian tissue culture (MARTINS *et al.*, 2008). This same concentration of GDF-9 alone or in combination with FSH, favored the *in vitro* growth of secondary preantral follicles, isolated from mouse ovaries (HAYASHI *et al.*, 1999) and this association promotes the maintenance of viability and proliferation of follicular granulosa cells in humans (HREINSSON *et al.*, 2002).

Follicle stimulating hormone plays a key role in the regulation of gonadal functions, being produced and secreted by the pituitary gland (ULLOA-AGUIRRE *et al.*, 1995). The actions of FSH are mediated at the ovarian somatic cell through of specific receptor presents on the surface of granulosa cells (MINJ *et al.*, 2008). However, preantral follicles are sensitive to FSH because their receptors are expressed in bovine granulosa cells (XU *et al.*, 1995). Several *in vitro* studies have shown that FSH may promote the formation of antrum

during culture of secondary follicles (mice: SPEARS *et al.*, 1998; cows: GUTIERREZ *et al.*, 2000; goats: ZHOU & ZHANG, 2005; sheep: CECCONI *et al.*, 1999; swine: MAO *et al.*, 2002).

As described in several studies both FSH and GDF-9 are important for follicular development in different species (FSH: goats: MATOS *et al.*, 2007, MAGALHÃES *et al.*, 2009b; cows: GUTIERREZ *et al.*, 2000, GDF-9: goats: ALMEIDA *et al.*, 2011, MARTINS *et al.*, 2008; mice: REDDY *et al.*, 2009b). However, little is known about the mechanism by which these substances play their roles. Replication of follicular cells and expansion of the follicular antrum are both important, and both are probably stimulated by FSH and GDF-9. Proteoglycans and their glycosaminoglycan side chains are as osmotic solutes that act to increase the osmotic pressure inside of the follicle resulting in fluid accumulation (KOVACH *et al.*, 1995; ISHIHARA *et al.*, 1997). Moreover, the effect of GDF-9 associated with FSH on the *in vitro* development of bovine follicles, and how these factors stimulate the expression of proteins present in bovine follicular fluid were not investigated.

The objectives of this study were to evaluate the effect of FSH and GDF-9 on the growth and viability after *in vitro* culture of secondary follicles, as well as to evaluate the effect of FSH and GDF-9 on the expression of mRNA for PCNA, HAS 1, HAS 2, Versican and Perlecan in cultured bovine secondary follicles.

## **2. Material and Methods**

### **2.1. Ovaries**

Ovaries (40 pairs) from adult cows were collected at a local abattoir. After collection, the ovaries were washed once in 70% alcohol for about 10 sec, and then twice in 0.9% saline solution supplemented with penicillin (100µg/mL) and streptomycin (100µg/mL).

Subsequently, ovarian pairs from each animal were transported to the laboratory within an hour chilled at 4 °C (CHAVES *et al.*, 2008).

## **2.2. Preantral follicle isolation and selection**

In the laboratory, the ovaries from each animal were stripped of surrounding fat tissue and ligaments and fine slices of the ovarian cortex (1 - 2 mm) were cut from the ovarian surface using a sterile scalpel blade. The slices were subsequently placed into the fragmentation medium, consisting of  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> plus HEPES. Secondary follicles of approximately 0.2 mm of diameter were identified under a stereo-microscope (SMZ 645 Nikon, Tokyo, Japan) and manually microdissected from strips of ovarian cortex using 26 gauge (26 G) needles. Once follicles exhibited a visible oocyte surrounded by two or more layers of granulosa cells, an intact basal membrane, with no antral cavity, they were selected for culture.

## **2.3. *In vitro* culture of isolated bovine preantral follicle**

After selection, follicles were individually cultured in 100  $\mu$ L of culture medium under mineral oil in petri dishes (60 x 15 mm, Corning, USA). The control culture medium consisted of  $\alpha$ -MEM (pH 7.2 - 7.4) supplemented with 3.0 mg/mL bovine serum albumin (BSA), insulin 10  $\mu$ g/mL, transferrin 5.5  $\mu$ g/mL and selenium 5 ng/mL (ITS), 2 mM glutamine, 2mM hypoxanthine and 50  $\mu$ g/mL of ascorbic acid. Preantral follicles obtained were randomly distributed in the following treatments:  $\alpha$ -MEM alone (culture control) or associated with fixed concentration of GDF-9 (200 ng/mL) or in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> supplemented with increased concentrations of recombinant (rFSH) corresponding to sequential medium or both.

The sequential medium consisted: FSH 100 ng/mL from day 0 to day 6 and FSH 500 ng/mL (from day 7 to day 12). The follicles were incubated at 39°C, 5% CO<sub>2</sub> in air, for 12 days. On days 2, 4, 8 and 10 of culture, 60µL of the medium was replaced with fresh medium, except on day 6 of culture, where the total replacement of medium (100 µL) was performed in order to change the concentration of FSH.

For each treatment, approximately 30 cultured follicles were collected for real-time PCR and 10 follicles collected for fluorescence microscopy analyses. The morphology and follicular diameter were assessed at the beginning and end of culture on the inverted microscope. In addition, the percentage of secondary follicles that reached antrum formation *in vitro* was determined.

#### **2.4. Expression of mRNA for PCNA and proteins present in fluid follicular in cultured follicles**

To evaluate the effect of GDF-9, FSH and their combination on expression of mRNA for HAS 1, HAS 2, Versican, Perlecan and PCNA after culture, three groups of eight follicles cultured in all treatments, were collected after 12 days and then stored at -80°C until extraction of total RNA.

Total RNA extraction was performed using Trizol purification kit (Invitrogen, São Paulo, Brazil). According to the manufacturer's instructions, 800 µL of Trizol solution was added to each frozen samples and the lysate was aspirated through a 20-gauge needle before centrifugation at 10,000 g for 3 min at room temperature. Thereafter, all lysates were diluted 1:1 with 70% ethanol and subjected to a mini-column. After binding of the RNA to the column, DNA digestion was performed using RNase-free DNase (340 Kunitz units/mL) for

15 min at room temperature. After washing the column three times, the RNA was eluted with 30  $\mu$ L RNase-free water.

Prior to reverse transcription, the eluted RNA samples were incubated for 5 min at 70°C, and chilled on ice. Reverse transcription was then performed in a total volume of 20 $\mu$ L, which was comprised of 10  $\mu$ L of sample RNA, 4  $\mu$ L 5X reverse transcriptase buffer (Invitrogen, São Paulo, Brazil), 8 units RNaseout, 150 units Superscript III reverse transcriptase, 0.036 U random *primers* (Invitrogen, São Paulo, Brazil), 10 mM DTT, and 0.5 mM of each dNTP. The mixture was incubated for 1 h at 42°C, for 5 min at 80°C, and then stored at -20°C. Negative controls were prepared under the same conditions, but without the inclusion of the reverse transcriptase.

Quantification of mRNA was performed using SYBR Green. PCR reactions were composed of 1  $\mu$ L cDNA as a template in 7.5  $\mu$ L of SYBR Green Master Mix (PE Applied Biosystems, Foster City, CA), 5.5  $\mu$ L of ultra-pure water, and 0.5  $\mu$ M of each primer. The primers were designed to perform amplification of mRNA for HAS 1, HAS 2, Versican, Perlecan, PCNA and housekeeping gene UBQ (Table 1). The thermal cycling profile for the first round of PCR was: initial denaturation and activation of the polymerase for 10 min at 95°C, followed by 50 cycles of 15 sec at 95°C, 30 sec at 58°C, and 30 sec at 60°C. The final extension was for 10 min at 72°C. All reactions were performed in a real time PCR Realplex (Eppendorf, Germany). The delta-delta-CT method was used to transform CT values into normalized relative expression levels (Livak and Schmittgen 2001).

#### **2.4. Assessment of preantral follicle viability**

For a more precise evaluation of follicular quality after 12 days of culture, live/dead fluorescent staining was performed on cow isolated cultured follicles. Briefly, the follicles

were incubated with the fluorescent probes calcein-AM (4  $\mu$ M) and ethidium homodimer-1 (2  $\mu$ M) (Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe, Germany) in 100  $\mu$ L droplets of Phosphate Buffer Saline at 37°C for 15 min. After incubation, the follicles were washed three times with TCM-HEPES and evaluated under a fluorescence microscope (Nikon, Eclipse 80i, Tokyo, Japan). The emitted fluorescent signals of calcein-AM (green) and ethidium homodimer-1 (red) were collected at 488 and 568 nm, respectively. Oocytes and granulosa cells were considered to be alive if their cytoplasm was stained positively with calcein-AM and if chromatin was not labeled with ethidium homodimer-1.

#### **2.4. Statistical analysis**

In the analysis of discrete variables, i.e., number of normal morphologically follicles (follicular survival) and antrum formation during the culture period, data were grouped into "pools" for each treatment and analyzed by frequency dispersion by Chi-square test, being the results expressed in percentage. The results corresponding to the follicular diameter were subjected to tests of Bartlett and Shapiro-Wilk to verify of normality of distribution and homoscedasticity, respectively. Not having been confirmed to perform requirements analysis of variance, even after data transformation, the diameters were compared using the Kruskal-Wallis nonparametric test. ANOVA using General Linear Model (GLM) procedure of SAS was used to test the effect of  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> alone or cultured with GDF-9, FSH or both on the relative expression of HAS 1, 2, Versican, Perlecan and PCNA on follicles submitted to culture for 12 days. If an effect of treatment were significant, data were further examined by Tukey test to locate differences among treatments. A probability of  $p < 0.05$  indicated that a difference was significant. Data are given as the mean  $\pm$  standard deviation (SD).

### 3. Results

#### 3.1. Follicular growth, survival and viability

Compared to day 0, preatral follicles cultured in medium supplemented with FSH, GDF-9 or GDF-9 + FSH had a significant increase in their diameter after 6 and 12 days of culture. On the other hand, follicles cultured in MEM alone had a significant increase in their diameter only after 12 days of culture ( $p < 0.05$ , Table 2). When comparisons among treatments were performed after 6 days of culture, follicles cultured in the presence of FSH or FSH + GDF-9 had a significant increase in their diameter when compared with those cultured in MEM alone or supplemented with GDF-9. Moreover, after 12 days of culture, FSH, GDF-9 or FSH + GDF-9 promoted a significant increase in follicular diameter when compared with MEM alone ( $p < 0.05$ , Table 2). However, a positive interaction between FSH and GDF-9 was observed neither after 6 nor after 12 days of culture. In addition, at the end of culture, GDF-9 inhibited the follicular growth stimulated by FSH.

After 12 days of culture the rate of antrum formation significantly increased in the presence of FSH (64.71%) and GDF-9 (48.48%) when compared to the day 6 of culture. Moreover, the rate of antrum formation was significantly higher in FSH treatments (64.71%) or GDF-9 (48.48%) after 12 days of culture when comparing to the other treatments ( $p < 0.05$ , Table 3).

Regarding the rate of follicular survival, the control (MEM) reduced significantly the rate of follicular survival on days 6 and 12 of culture ( $p < 0.05$ ) when compared to day 0. On the other hand, the presence of FSH, GDF-9 or FSH + GDF-9 maintained the rate of follicular survival similar to day 0 until the end of culture (Table 4). When all treatments were compared to each other, there was no significant difference between them ( $p > 0.05$ , Table 4).



Fluorescence analysis of bovine secondary follicles cultured for 12 days in MEM alone or supplemented with FSH, GDF-9, or both, showed that follicles considered morphologically normal during light microscopy analysis had positive reaction for calcein-AM, but not for ethidium homodimer-1 (Figure 1), which confirmed their viability.

### **3.2. Expression of mRNA for proteins in fluid follicular and PCNA in cultured follicles**

Analysis of mRNA levels for proteins involved in antrum formation showed that follicles cultured in presence of GDF-9 had a small, but significant ( $P < 0.05$ ) decrease in the levels of mRNA for HAS 1, when compared to MEM (Fig. 2A). On the other hand, the presence of both FSH and GDF-9 significantly increased the levels of mRNA for HAS 2 (Fig. 2B), which was not observed for follicles cultured in MEM alone or supplemented with GDF-9 or FSH alone. In addition, follicles cultured in medium supplemented with GDF-9 or both FSH and GDF-9 had significantly higher levels of mRNA for Versican (Fig. 2C) than those cultured in MEM or MEM plus FSH ( $P < 0.05$ ). GDF-9 also significantly increased the levels of mRNA for Perlecan when compared to other treatments (Fig. 2D). With regard to PCNA mRNA expression, after follicle culture, FSH alone or associated with GDF-9 significantly reduced the levels of this transcript (Fig. 2E) when compared to control medium.

## **4. Discussion**

In this study, the addition of FSH and GDF-9 promoted the *in vitro* growth of bovine preantral follicles. In fact, studies have reported the importance of both substances to the *in vitro* development of preantral follicles in different species (FSH: goats: MATOS *et al.*, 2007, MAGALHÃES *et al.*, 2009b; sheep: CECCONI *et al.*, 1999, cows: GUTIERREZ *et al.*, 2000;

pigs: MAO *et al.*, 2002, GDF-9: goats: ALMEIDA *et al.*, 2011, MARTINS *et al.*, 2008; mice: REDDY *et al.*, 2009b). In species different from bovine, the action of GDF-9 on follicular growth may be associated with its ability to stimulate the oocyte growth and follicular development (rat: HAYASHI *et al.*, 1999, goat: MARTINS *et al.*, 2008), granulosa cell proliferation and the differentiation in preantral follicles in small antral follicles of (immature rats: VITT *et al.*, 2000b; humans: HREINSSON *et al.*, 2002). However, in our study, GDF-9 inhibited follicular growth stimulated by FSH after 12 days of culture. In rats, GDF-9 suppresses the FSH stimulation of cAMP production, suggesting that this TGF- $\beta$ -related hormone could modulate gonadotropin action by suppressing the protein kinase A pathway induced by FSH (VITT *et al.*, 2000b). In addition, THOMAS *et al.*, (2005) found no positive interaction between FSH and GDF-9 during *in vitro* culture of mice preantral follicles. Furthermore, in sheep, a study of granulosa cells showed that FSH regulates the expression of specific receptors (BMPRII and ALK-5) that influences the action of GDF-9 (QIN CHEN *et al.*, 2009).

The action of FSH in promoting growth, survival and antrum formation can be attributed to the addition of this hormone to the medium in increasing concentrations throughout the culture. The addition of increasing concentrations of FSH was performed in order to meet the growing demand of developing follicles. Studies in goats showed that sequential addition of FSH (100 ng/mL from D0 to D6, 500 ng/mL from D7 to D12 and 1000 ng/mL from D13 to D18) promotes viability and development from secondary to tertiary follicles (SARAIVA *et al.*, 2011). The mechanisms by which FSH increased follicles growth in this study is still not clear, since this hormone did not stimulate the expression of proteins involved with antrum formation and have reduced the expression of PCNA after culture of bovine follicles. It is known that FSH is essential for granulosa cell differentiation and steroid synthesis (HUNZICKER-DUNN & MAIZELS, 2006), as well as for follicle maturation

(ADASHI *et al.*, 1994). McGEE *et al.*, 1997b showed that addition of FSH to medium enhances the progression of differentiation, as demonstrated by increased inhibin-a protein production. Thus, it can be hypothesized that FSH is favouring steroidogenesis, but not proliferation of granulosa cells.

The presence of GDF-9 in culture medium increased the levels of mRNA for Versican and Perlecan and promoted of antrum formation in cultured follicles. Other studies confirm that the GDF-9 promotes the growth and the transition from preantral to early antral in rats (ORISAKA *et al.*, 2006). Versican and Perlecan are proteoglycans that directly contribute to the osmotic potential of follicular fluid by virtue of the high sulfation status of chondroitin sulfate side chains attached to its core protein (RAHMANI *et al.*, 2006). Perlecan and Versican were previously identified in bovine (McARTHUR *et al.*, 2000) and human follicular fluid (ERIKSEN *et al.*, 1999), while their RNA were detected in granulosa cells (PRINCIVALLE *et al.*, 2001, IRVING-RODGERS *et al.*, 2004). Several studies have shown that antrum formation is an event independent of gonadotropins (macaca: GULYAS *et al.*, 1977; mice: HALPIN *et al.*, 1986; human: HILLIER *et al.*, 1994; rat: CAIN *et al.*, 1995). In accordance to this information, FSH alone did not stimulate the expression of mRNA for a HAS 1, HAS 2, Perlecan and Versican in cultured bovine follicles. Thus, the mechanisms by which FSH has stimulated antrum formation in cultured bovine follicles are still to be completely elucidated. Probalby, the action of FSH in bovine follicles depends on endogenous GDF-9, since these two substances positively interacted and stimulated the expression of HAS 2. Other *in vitro* studies have shown that FSH stimulates antrum formation in several species (mice: SPEARS *et al.*, 1998; rats: McGEE *et al.*, 1997b; women: WRIGHT *et al.*, 1999; cows: GUTIERREZ *et al.*, 2000; goats: ZHOU & ZHANG, 2005; sheep: CECCONI *et al.*, 1999; porcine: MAO *et al.*, 2002).

In the present study high follicular survival rates were obtained after culture in all treatments. This fact can be explained by use of a basal medium, extremely rich and able to provide the proper nutritional support to maintain follicular survival. In agreement with our results,  $\alpha$ -MEM is also very efficient to promote survival of mouse preantral follicles (KIM *et al.*, 2008). This medium presents high concentrations of precursors of DNA, ribonucleosides and deoxynucleosides with several substances such as vitamins, inorganic salts, antioxidants and energy substrates that have beneficial effect on survival follicular, independent of the addition of hormones and growth factors (HARTSHORNE, 1997; VAN WEZEL & RODGERS, 1996).

In conclusion, this study demonstrates that addition of FSH and/or GDF-9 promote follicular growth, but these factors did not interact positively in follicular growth. Moreover, GDF-9 stimulates the expression of Versican and Perlecan and interacts positively with FSH to increase the expression of HAS 2.

### **Acknowledgement**

This study was supported by CNPq (Grant N° 477025 / 2009-9).

### **Reference**

- AALTONEN, J.; LAITINEN, M. P.; VUOJOLAINEN, K.; JAATINEN, R.; HORELLI-KUITUNEN, N.; SEPPA, L.; LOUHIO, H.; TUURI, T.; SJOBERG, J.; BUTZOW, R.; HOVATA, O.; DALE, L.; RITVOS, O. Human growth differentiation factor 9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 84, p. 2744–2750, aug. 1999.
- ADASHI, E. Y. Endocrinology of the ovary. **Human Reproduction**, v. 5, p. 815–827, 1994.
- ALMEIDA, A. P.; SARAIVA, M. V. A.; ARAÚJO, V. R.; MAGALHÃES, D. M.; DUARTE, A. B. G.; FROTA, I. M. A.; LOPES, C. A. P.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Expression of growth and differentiation factor 9 (GDF-9) and its effect on the *in vitro* culture of caprine preantral ovarian follicles. **Small Ruminant Research**, v. 100, p. 169-176, oct. 2011.

ARUNAKUMARI, G.; SHANMUGASUNDARAM, N.; RAO, V. H. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. **Theriogenology**, v. 74, p. 884-894, sep. 2010.

CAIN, L. S.; CHATTERJEE, A.; COLLINS, T. J. *In vitro* folliculogenesis of rat preantral follicles. **Endocrinology**, v. 136, p. 3369-77, aug.1995.

CECCONI, S.; BARBONI, B.; COCCIA, M.; MATTIOLI, M. *In vitro* development of sheep preantral follicles. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 594-601, mar. 1999.

CHAVES, R. N.; MARTINS, F. S.; SARAIVA, M. V.; CELESTINO, J. J.; LOPES, C. A.; CORREIA, J. C.; VERDE, I. B.; MATOS, M. H.; BÁO, S. N.; NAME, K. P.; CAMPELLO, C. .C.; SILVA, J. R.; FIGUEIREDO, J. R. Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured *in vitro*. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, p. 640-647, 2008.

ELVIN, J. A.; YAN, C.; MATZUK, M. M. Oocyte-expressed TGF-beta superfamily members in female fertility. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 159, p. 1-5, jan. 2000.

GULYAS, B. J.; HODGEN, G. D.; TULLNER, W. W.; ROSS, G. T. Effects of fetal or maternal hypophysectomy on endocrine organs and body weight in infant rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): with particular emphasis on oogenesis. **Biology of Reproduction**, v. 16, p. 216-227, mar.1977.

GUTIERREZ, C. G.; RALPH, J. H.; TELFER, E. E.; WILMUT, I.; WEBB, R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 1322-1328, may. 2000.

H Aidari, K.; SALEHnia, M.; VALOJERDI, M. R. The effect of leukemia inhibitory factor and co-culture on the *in vitro* maturation and ultrastructure of vitrified isolated mouse preantral follicles. **Fertility and Sterility**, v. 90, p. 2389-97, dec. 2008.

HALPIN, D. M.; JONES, A.; FINK, G.; CHARLTON, H. M. Postnatal ovarian follicle development in hypogonadal (hpg) and normal mice and associated changes in the hypothalamic-pituitary ovarian axis. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 77, p. 287-296, may. 1986.

HARTSHORNE, G. M. *In vitro* culture of ovarian follicles. **Reviews of Reproduction**, v. 2, p. 94-104, 1997.

HAYASHI, M.; McGEE, E. A.; MIN, G.; KLEIN, C.; ROSE, U. M.; VAN DUIN, M.; HSUEH, A. J. Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. **Endocrinology**, v. 140, p. 1236-1244, mar. 1999.

HILLIER, S. G. Current concepts the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis. **Human Reproduction**, v. 9, p. 188-191, 1994.

HREINSSON, J. G.; SCOTT, J. E.; RASMUSSEN, C.; SWAHN, M. L.; HSUEH, A. J.; HOVATTA, O. Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, p. 316-321, jan. 2002.

HUNZICKER-DUNN, M.; MAIZELS, E. T. FSH signaling pathways in immature granulosa cells that regulate target gene expression: branching out from protein kinase A. **Cell Signaling**, v. 18, p. 1351-9, sep. 2006.

ISHIHARA, H.; WARENSJO, K.; ROBERTS, S.; URBAN, J. P. Proteoglycan synthesis in the intervertebral disk nucleus: the role of extracellular osmolality. **American Journal of Physiology**, v. 272, p. 1499–1506, may. 1997.

ITOH, T.; KACCHI, M.; ABE, H.; SENDAI, Y.; HOSHI, H. Growth, antrum formation, and estradiol production of bovine preantral follicles cultured in a serum-free medium. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1099-1105, oct. 2002.

JUENGEL, J. L.; HUDSON, N. L.; HEATH, D. A.; SMITH, P.; READER, K. L.; LAWRENCE, S. B.; O'CONNELL, A. R.; LAITINEN, M. P. E.; CRANFIELD, M.; GROOME, N. P.; RITVOS, O.; McNATTY, K. P. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1777–1789, dec. 2002.

KEDEM, A.; FISCH, B.; GAROR, R.; BEN-ZAKEN, A.; GIZUNTERMAN, T.; FELZ, C.; BEN-HAROSH, A.; KRAVARUSIC, D.; ABIR, R. Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15)/Growth Differentiating Factor 9 heterodimer is more potent than BMP15 alone in *in vitro*. **Activation of Human Primordial Follicles**, feb. 2011. doi: 10.1210/jc.2010-1749.

KIM, J.; CHU, J.; SHEN, X.; WANG, J.; ORKIN, S. H. An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells. **Cell**, v. 132, p. 1049-1061, mar. 2008.

KOVACH, I. S. The importance of polysaccharide configurational entropy in determining the osmotic swelling pressure of concentrated proteoglycan solution and the bulk compressive modulus of articular cartilage. **Biophysical Chemistry**, v. 53, p. 181–187, feb. 1995.

LIVAK, K. J. and SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $-2\Delta\Delta CT$  method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

MAGALHÃES, D. M.; ARAÚJO, V. R.; LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H.; SILVA, R. C.; LUCCI, C. M.; BÃO, S. N.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Impact of pituitary FSH purification on *in vitro* early folliculogenesis in goats. **Biocell**, v. 33, p. 91-97, aug. 2009b.

MAGALHÃES, D. M.; DUARTE, A. B. G.; ARAÚJO, V. R.; BRITO, I. R.; SOARES, T. G.; LIMA, I. M. T.; LOPES, C. A. P.; CAMPELLO, C. C.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. *In vitro* production of a caprine embryo from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone. **Theriogenology**, v. 75, p. 182–188, jan. 2011a.

MAO, J.; WU, G.; SMITH, M. F.; McCAULEY, T. C.; CANTLEY, T. C.; PRATHER, R. S.; DIDION, B. A.; DAY, B. N. Effects of culture medium, serum type, and various

concentrations of follicle-stimulating hormone on porcine preantral follicular development and antrum formation *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1197–1203, oct. 2002.

MARKSTROM, E.; SVENSSON, E. C. H.; SHAO, R.; SVANBERG, B.; BILLIG, H. Survival factors regulating ovarian apoptosis - dependence on follicle differentiation **Reproduction**, v. 123, p. 23-30, jan. 2002.

MARTINS, F. S.; CELESTINO, J. J. H.; SARAIVA, M. V. A.; MATOS, M. H. T.; BRUNO, J. B.; ROCHA-JUNIOR, C. M. C.; LIMA-VERDE, I. B.; LUCCI, C. M.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Growth and differentiation factor-9 stimulates activation of goat primordial follicles *in vitro* and their progression to secondary follicles. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, p. 916–924, 2008.

MATOS, M. H. T.; LIMA-VERDE, I. B.; LUQUE, M. C.; MAIA JR, J. E.; SILVA, J. R. V.; CELESTINO, J. J.; MARTINS, F. S.; BÁO, S. N.; LUCCI, C. M.; FIGUEIREDO, J. R. Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability *in vitro*. **Zygote**, v. 15, p. 173-182, apr. 2007.

MAZERBOURG, S.; KLEIN, C.; ROH, J.; KAIVO-OJA, N.; MOTTERSHEAD, D. G.; KORCHYNSKYI, O.; RITVOS, O.; HSUEH, A. J. Growth differentiation factor-9 (GDF-9) signalling is mediated by the type 1 receptor ALK5. **Molecular Endocrinology**, v. 18, p. 653–655, mar. 2004.

McGEE, E.; SPEARS, N.; MINAMI, S.; HSU, S.Y.; CHUN, S.Y.; BILLIG, H.; HSUEH, A. J. W. Preantral ovarian follicles in serum-free culture: suppression of apoptosis after activation of the cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate pathway and stimulation of growth and differentiation by follicle-stimulating hormone. **Endocrinology**, v. 138, p. 2417-2424, jun. 1997b.

MINJ, A.; MONDAL, S.; TIWARI, A. K.; SHARMA, B.; VARSHNEY, V. P. Molecular characterization of follicle stimulating hormone receptor (FSHR) gene in the Indian river buffalo (*Bubalus bubalis*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 158, p. 147–153, sep. 2008.

ORISAKA, M.; ORISAKA, S. J.; JIN-YI CJ, WANG, Y.; KOTSUJI, F.; TSANG, B. K. Growth differentiation factor-9 is anti-apoptotic during follicular development from preantral to early antral stage. **Molecular Endocrinology**, v. 20, p. 2456–2468, oct. 2006.

PENNETIER, S.; UZBEKOVA, S.; PERREAU, C.; PAPILLIER, P.; MERMILLOD, P.; DALBIES-TRAN, R. Spatio-temporal expression of the germ cell marker genes *MATER*, *ZAR1*, *GDF9*, *BMP15*, and *VASA* in adult bovine tissues, oocytes, and preimplantation embryos. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 1359–1366, oct. 2004.

QIN CHEN, A.; YU, S. D.; WANG, Z. G.; XU, Z. R.; YANG, Z. G. Stage-specific expression of bone morphogenetic protein type I and type II receptor genes: effects of follicle-stimulating hormone on ovine antral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 111, p. 391–399, apr. 2009.

RAHMANI, M.; WONG, B. W.; ANG, L.; CHEUNG, C. C.; CARTHY, J. M.; WALINSKI, H.; MCMANUS, B. M. Versican: signaling to transcriptional control pathways. **Canadian Journal Physiology Pharmacology**, v. 84, p. 77–92, jan.2006.

REDDY, P.; ZHENG, W.; LIU, K. Mechanisms maintaining the dormancy and survival of mammalian primordial follicles. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.21, p. 96-103, feb. 2009b.

SARAIVA, M. V. A.; CELESTINO, J. J. H.; ARAÚJO, V. R.; CHAVES, R. N.; ALMEIDA, A. P.; LIMA-VERDE, I. B.; DUARTE, A. B. G.; SILVA, G. M.; MARTINS, F. S.; BRUNO, J. B.; MATOS, M. H. T.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Expression of follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) in goat ovarian follicles and the impact of sequential culture medium on *in vitro* development of caprine preantral follicles. **Zygote**, v. 21, p. 1-10, aug. 2011.

SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R.; VAN TOL, H. T. A.; ROELEN, B. A. J.; FIGUEIREDO, J. R. Expression of growth differentiation factor 9 (GDF9), bone morphogenetic protein 15 (BMP15), and BMP receptors in the ovaries of goats. **Molecular Reproduction and Development**, v. 70, p. 11-19, jan. 2005.

SKINNER, M. K. Regulation of primordial follicle assembly and development. **Human Reproduction Update**, v. 11, p. 461–471, oct. 2005.

SPEARS, N.; MURRAY, A. A.; ALISSON, V.; BOLAND, N. I.; GOSDEN, R. G. Role of gonadotrophins and ovarian steroids in the development of mouse follicles *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 113, p. 19-26, may. 1998.

SPICER, L. J.; AAD, P. Y.; ALLEN, D. T.; MAZERBOURG, S.; PAYNE, A. H.; HSUEH, A. J. Growth differentiation factor 9 (GDF9) stimulates proliferation and inhibits steroidogenesis by bovine theca cells: Influence of follicle size on responses to GDF9. **Biology of Reproduction**, v. 78, p. 243–253, feb. 2008.

SPICER, L. J.; AAD, P. Y.; ALLEN, D.; MAZERBOURG, S.; HSUEH, A. J. Growth differentiation factor-9 has divergent effects on proliferation and steroidogenesis of bovine granulosa cells. **Journal of Endocrinology**, v. 189, p. 329-39, may. 2006.

TEN DIJK, P.; MIYAZONO, K.; HELDIN, C. H. Signaling inputs converge on nuclear effectors in TGF- $\beta$  signaling. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 25, p. 64-70, feb. 2000.

THOMAS, F. H.; ETHIER, J. F.; SHIMASAKI, S.; VANDERHYDEN, B. C. Follicle stimulating hormone regulates oocyte growth by modulation of expression of oocyte and granulosa cell factors. **Endocrinology**, v. 146, p. 941-949, feb. 2005.

ULLOA-AGUIRRE, A.; MIDGLEY, J. R. A. R.; BEITINS, I. Z.; PADMANABHAN, V. Follicle-stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. **Endocrine Reviews**, v. 16, p. 765–787, dec. 1995.

VAN WEZEL, I.; RODGERS, R. J. Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment *in vivo*. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1003-1011, 1996.



VITT, U. A.; HAYASHI, M.; KLEIN, C.; HSUEH, A. J. Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 370-377, feb. 2000b.

VITT, U.A.; MAZERBOURG, S.; KLEIN, C.; HSUEH, A. J. W. Bone morphogenetic protein receptor type II is a receptor for growth differentiation factor-9. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 473-480, aug. 2002.

WRIGHT, C. S.; HOVATTA, O.; MARGARA, R.; TREW, G.; WINSTON, R. M. L.; FRANKS, S.; HARDY, K. Effects of follicle-stimulating hormone and serum substitution on the *in-vitro* growth of human ovarian follicles. **Human Reproduction**, v. 14, p. 1555-1562, jun. 1999.

XU, Z.; GARVERICK, H. A.; SMITH, G. W.; SMITH, M. F.; HAMILTON, S. A.; YOUNGQUIST, R. S. Expression of folliclestimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 951-957, oct. 1995.

ZHOU, H.; ZHANG, Y. Regulation of *in vitro* growth of preantral follicles by growth factors in goats. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 28, p. 235-242, apr. 2005.

**Table 1.** Primer pairs used in real-time PCR for quantification of proteins presents of follicular fluid and PCNA in cultured bovine follicles.

Target gene	Primer sequence (5'→ 3')	Sense (s), anti-sense (As)	Position	GenBank accession no.
UBQ	GAAGATGGCCGCACTCTTCTGAT	S	607-631	GI: 57163956
	ATCCTGGATCTTGGCCTTCACGTT	As	756-780	
VERSICAN	TTGGTGCGCTTTGTGAGCAA	S	9515-9235	GI:31341650
	ATGGCCCACACGATTCACAA	As	9685-9705	
PERLECAN	TGATGAGGCCTCGGGAGACT	S	19-39	GI:49617250
	CGACACCTCTCGGAACTCCT	As	152-172	
PCNA	TGCCGAGATCTCAGTCACAT	S	566-586	GI:77735938
	TATGGCAACAGCTTCCTCCT	As	695-715	
HAS 1	TACTGGGTGGCCTTCAATGT	S	1636-1656	GI:297485936
	AACTGCTGCAGGAGGTTGTT	As	1722-1742	
HAS 2	ACTCCTGGGTGGTGTGATTT	S	2005-2025	GI:31342885
	TTCTTCCGCCTGCCACATTT	As	2149-2169	

**Table 2.** Follicular diameter after culture of secondary follicles in MEM supplemented with GDF-9, FSH or both.

	MEM	FSH	GDF-9	FSH+GDF-9
D0	175.48±46.88 Ab	174.85 ± 46.73 Ac	178.37 ± 40.01 Ac	161.13 ± 35.16 Ab
D6	188.12 ± 43.91 Bb	240.54 ± 71.86 Ab	213.53 ± 50.06 ABb	224.09 ± 56.44 Aa
D12	215.17 ± 45.86 Ca	298.06 ± 85.77 Aa	250.38 ± 65.52 Ba	259.10 ± 83.13 Ba

Uppercase letters represent distinct differences between columns (treatments). Lowercase letters represent significant differences between different lines (culture times).

**Table 3.** Antrum formation after culture of secondary follicles in MEM supplemented with GDF-9, FSH or both.

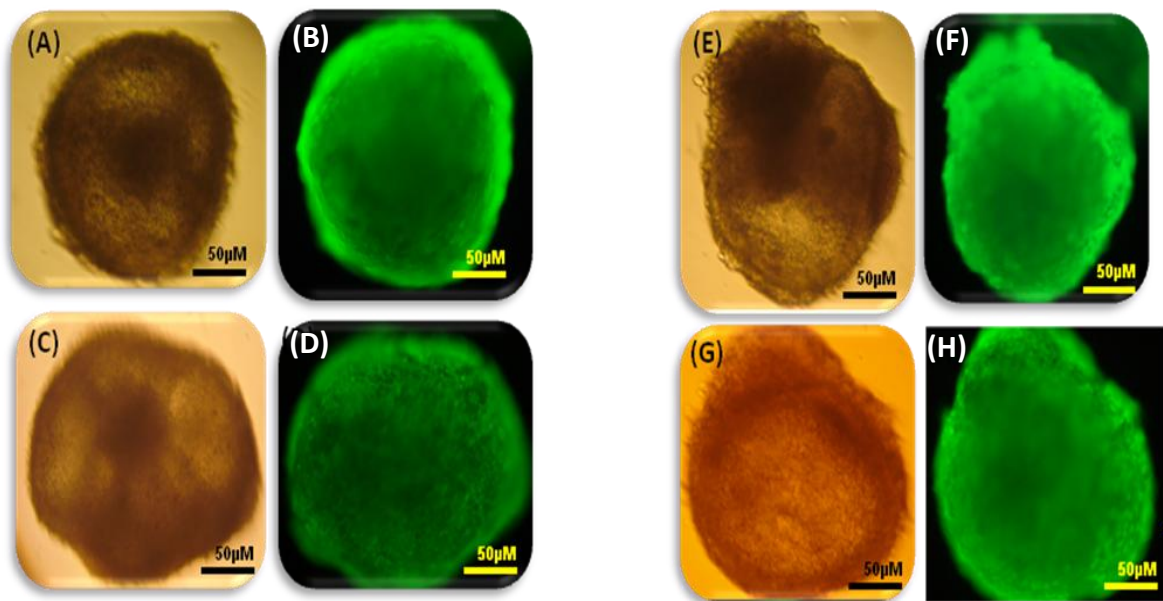
	MEM	FSH	GDF-9	FSH+GDF-9
D0	0.00% (0/31)	0.00% (0/34)	0.00% (0/33)	0.00% (0/33)
D6	19.35% (6/31) Aa	23.53% (8/34) Ab	12.12% (4/33) Ab	15.15% (5/33) Ab
D12	38.71% (12/31) Ba	64.71% (22/34) Aa	48.48% (16/33) Aba	36.36% (12/33) Ba

Uppercase letters represent distinct differences between columns (treatments). Lowercase letters represent significant differences between different lines (culture times).

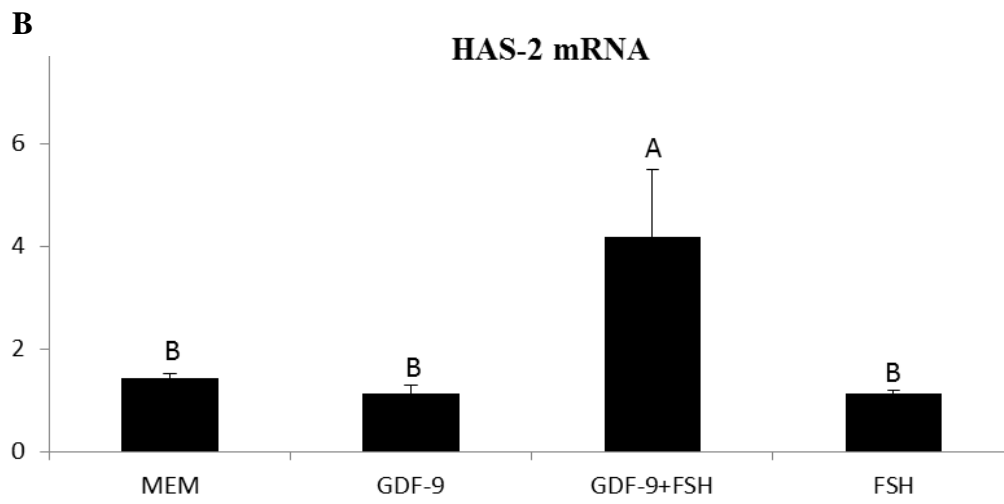
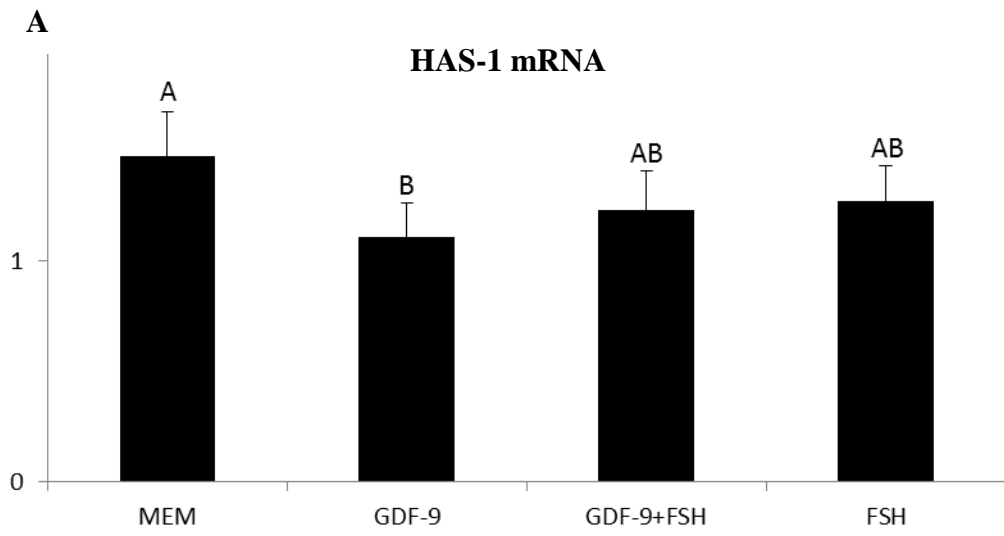
**Table 4.** Follicular survival after culture of secondary follicles in MEM supplemented with GDF-9, FSH or both.

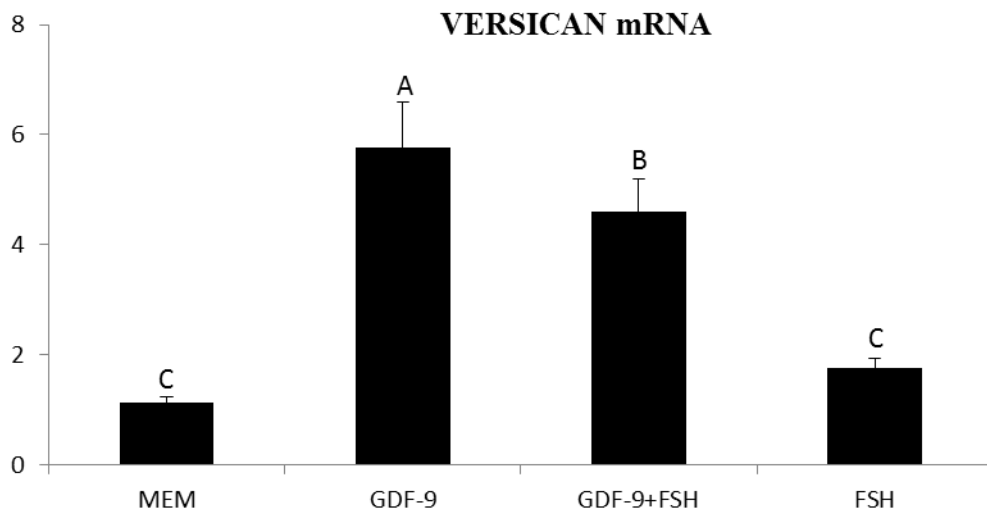
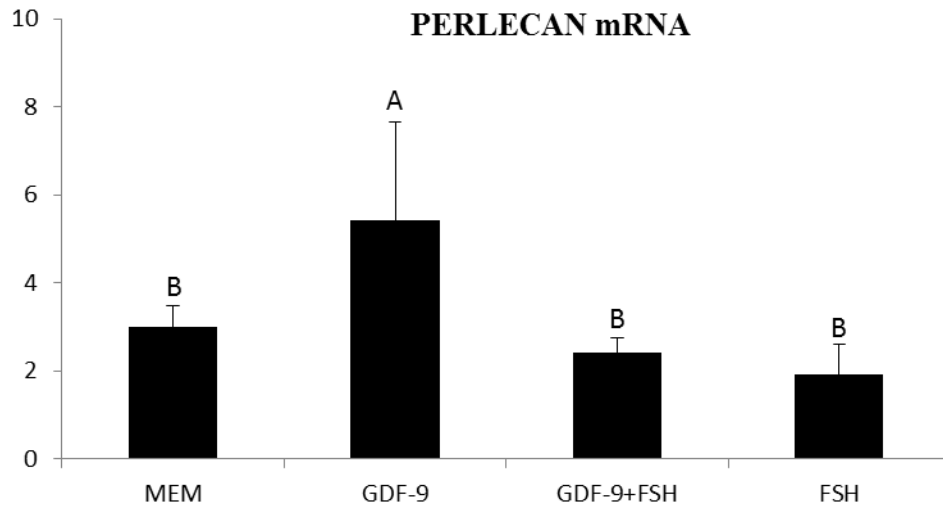
	MEM	FSH	GDF-9	FSH+GDF-9
D0	100% (31/31) Aa	100% (34/34) Aa	100.00% (33/33) Aa	100.00% (33/33) Aa
D6	93.55% (29/31) Aab	100% (34/34) Aa	100.00% (33/33) Aa	100.00% (33/33) Aa
D12	87.10% (27/31) Ab	97.06% (33/34) Aa	93.94% (31/33) Aa	96.97% (32/33) Aa

Uppercase letters represent distinct differences between columns (treatments). Lowercase letters represent significant differences between different lines (culture times).

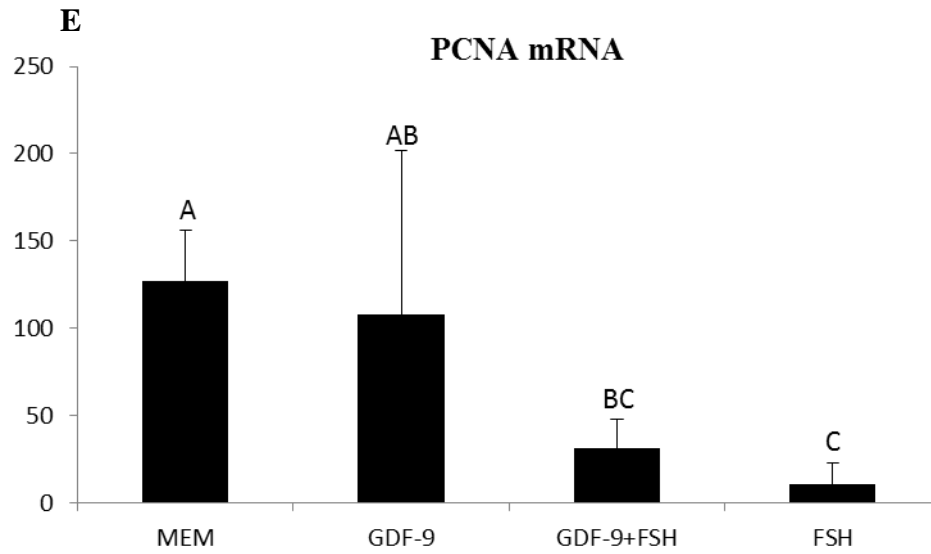


**Figure 1.** Follicle isolated analyzed by fluorescence microscope (A, B); Preantral follicle cultured for 12 days in MEM (C, D); Preantral follicle cultured for 12 days in GDF-9; (E, F) Follicle preantral cultured for 12 days in GDF + FSH; (G, H) Preantral follicles cultured for 12 days in FSH. Scale bar represents 50 micrometers.



**C****D**





**Figure 2.** Relative expression of mRNA in bovine ovarian follicles (means  $\pm$  SD) A) HAS 1 B) HAS 2 C) Versican D) Perlecan E) PCNA.

AB significant difference between treatments ( $p < 0.05$ ).

## 7. CONCLUSÕES GERAIS

- A adição de FSH e/ou GDF-9 no meio de cultivo promove o crescimento folicular e formação de cavidade, porém a presença de ambos, FSH e GDF-9 não interagem positivamente para estimular o crescimento de folículos secundários em bovinos.
- O cultivo de folículos secundários bovinos na presença de GDF-9 aumenta a expressão do RNAm para Versican e Perlecan, enquanto que FSH associado com GDF-9 aumenta a expressão do RNAm para HAS 2.

## 8. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos nesta pesquisa evidenciaram informações valiosas, sobre o efeito do FSH e do GDF-9 sobre a expressão do RNAm para PCNA e proteínas que estão envolvidas na formação do fluido folicular, como HAS 1, HAS 2, Versican e Perlecan. Além disso, foi evidenciada a participação do FSH e do GDF-9 na sobrevivência, formação de antro e na promoção do desenvolvimento dos folículos cultivados.

Estudos adicionais poderão ser desenvolvidos, afim de melhor esclarecer o papel destas substâncias e suas interações sobre o desenvolvimento de folículos secundários. Estes estudos contribuirão para a elucidação dos mecanismos que regulam o desenvolvimento folicular *in vitro*. Em adição, à utilização de FSH e GDF-9 sozinhos ou em combinação com outras substâncias (fatores e/ou hormônios) para o desenvolvimento de outros meios sequenciais, pode ser uma alternativa de sucesso na busca por melhores resultados de crescimento folicular e posterior maturação oocitária.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AALTONEN, J.; LAITINEN, M. P.; VUOJOLAINEN, K.; JAATINEN, R.; HORELLI-KUITUNEN, N.; SEPPA, L.; LOUHIO, H.; TUURI, T.; SJOBERG, J.; BUTZOW, R.; HOVATA, O.; DALE, L.; RITVOS, O. Human growth differentiation factor 9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 84, p. 2744–2750, aug. 1999.

ADAMS, G. P.; JAISWAL, B.; SINGH, J.; MALHI, P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. **Theriogenology**, v. 69, p. 72-80, jan. 2008.

ADASHI, E. Y. Endocrinology of the ovary. **Human Reproduction**, v. 5, p. 815–827, 1994.

ADHIKARI, D.; FLOHR, G.; GORRE, N.; SHEN, Y.; YANG, H.; LUNDIN, E.; LAN, Z.; GAMBELLO, M. J.; LIU, K. Disruption of Tsc2 in oocytes leads to overactivation of the entire pool of primordial follicles. **Molecular Human Reproduction**, v. 15, p. 765-770, dec. 2009.

ADHIKARI, D.; ZHENG, W.; SHEN, Y.; GORRE, N.; HÄMÄLÄINEN, T.; COONEY, A. J.; HUHTANIEMI I., LAN Z.J.; LIU K. Tsc/mTORC1 signaling in oocytes governs the quiescence and activation of primordial follicles. **Human Molecular Genetics**, v. 19, p. 397-410, feb. 2010.

ALMEIDA, A. P.; SARAIVA, M. V. A.; ALVES FILHO, J. G.; SILVA, G. M.; GONÇALVES, R. F. B.; BRITO, I. R.; SILVA, A. W. B.; LIMA, A. K. F.; CUNHA, R. M. S.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Gene Expression and Immunolocalization of Fibroblast Growth Factor 2 in the Ovary and Its Effect on the *In vitro* Culture of Caprine Preantral Ovarian Follicles. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 20-25, feb. 2012.

ALMEIDA, A. P.; SARAIVA, M. V. A.; ARAÚJO, V. R.; MAGALHÃES, D. M.; DUARTE, A. B. G.; FROTA, I. M. A.; LOPES, C. A. P.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Expression of growth and differentiation factor 9 (GDF-9) and its effect on the *in vitro* culture of caprine preantral ovarian follicles. **Small Ruminant Research**, v.100, p. 169-176, oct. 2011.

ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ORNTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, v. 64, p. 5245-5250, aug. 2004.

ANDERSON, E. L.; BALTUS, A. E.; ROEPERS-GAJADIEN, H. L.; HASSOLD, T. J, DE ROOIJ, D. G.; VAN PELT, A. M.; PAGE, D. C. Stra8 and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, p. 14976–14980, sep. 2008.

ARAÚJO V. R.; SILVA, C. M. G.; LIMA-VERDE, I. B.; MAGALHÃES, D. M.; SILVA G. M.; BÁO, S. N.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; TAVARES, L. M. T.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Effect of Bone Morphogenetic Protein-7 (BMP-7) on *in vitro*

survival of caprine preantral follicles. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p. 305-310, 2010.

ARUNAKUMARI, G.; SHANMUGASUNDARAM, N.; RAO, V. H. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. **Theriogenology**, v. 74, p. 884-894, sep. 2010.

BACCHI, C. E.; GOWN, A. M. Detection of cell proliferation in tissue sections. **Brazilian Journal of Medicina and Biological Research**, v. 26, p. 677-687, jul. 1993.

BAERWALD, A. R.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A. Characterization of ovarian follicular wave dynamics in women. **Biology of Reproduction**, v. 3, p. 1023-1031, sep. 2003.

BÁO, B.; GARVERICK, H. A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 1903-1921, jul. 1998.

BARNETT, K. R.; SCHILLING, C.; GREENFELD, C. R.; TOMIC, D.; FLAWS, J. A. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. **Human Reproduction Update**, v. 12, p. 537-55, sep. 2006.

BARROS, L. F.; HERMOSILLA, T.; CASTRO, J. Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 130, p. 401-409, oct. 2001.

BECKERS, J. F. The ovarian follicle in cow: *in vivo* growth and *in vitro* culture. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 31, p. 543-548, 1996.

BONNET, A.; DALBIE`S-TRAN, R.; SIRARD, M. A. Opportunities and challenges in applying genomics to the study of oogenesis and folliculogenesis in farm animals. **Reproduction**, v. 135, p. 119-128, 2008.

BRAW-TAL, R.; YOSSEFI, S. Studies *in vivo* and *in vitro* on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 109, p. 165-71, jan. 1997.

BRUNO, J. B.; CELESTINO, J. J. H.; LIMA-VERDE, I. B.; LIMA, L. F.; MATOS, M. H. T.; ARAÚJO, V. R.; SARAIVA, M. V. A.; MARTINS, F. S.; NAME, K. P. O.; CAMPELLO, C. C.; BÁO, S. N.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor in goat ovaries and improvement of *in vitro* caprine preantral follicle survival and growth with VEGF. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 21, p. 679-687, dec. 2009.

BRUNO, J. B.; CELESTINO, J. J. H.; LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H. T.; LIMA, L. F.; NAME, K. P. O.; ARAÚJO, V. R.; SARAIVA, M. V. A.; MARTINS, F. S.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Vasoactive intestinal peptide improves the survival and development of caprine preantral follicles after *in vitro* tissue culture. **Cells Tissues Organs**, v. 191, p. 414-421, dec. 2010.

CAIN, L. S.; CHATTERJEE, A.; COLLINS, T. J. *In vitro* folliculogenesis of rat preantral follicles. **Endocrinology**, v. 136, p. 3369-77, 1995.

CARLSSON, I. B.; SCOTT, J. E.; VISSER, J. A.; RITVOS, O.; THEMME, A. P.; HOVATTA, O. Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of growth of human primordial ovarian follicles *in vitro*. **Human Reproduction**, v. 21, p. 2223–2227, sep. 2006.

CARLSSON, P.; MAHLAPUU, M. Forkhead transcription factors: key players in development and metabolism. **Developmental Biology**, v. 250, p. 1–23, oct. 2002.

CECCONI, S.; BARBONI, B.; COCCIA, M.; MATTIOLI, M. *In vitro* development of sheep preantral follicles. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 594–601, mar. 1999.

CHANG, H.; BROWN, C.W.; MATZUK, M. M. Genetic Analysis of the Mammalian TGF- $\beta$  Superfamily. **Endocrine Reviews**, v. 23, p. 787 – 823, dec. 2002.

CHAVES, R. N.; MARTINS, F. S.; SARAIVA, M. V.; CELESTINO, J. J.; LOPES, C. A.; CORREIA, J. C.; VERDE, I. B.; MATOS, M. H.; BÁO, S. N.; NAME, K. P. Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured *in vitro*. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, p. 640–7, 2008.

CHEN, Y.; JEFFERSON, W. N.; NEWBOLD, R. R.; PADILLA-BANKS, E.; PEPLING, M. E. Estradiol, progesterone, and genistein inhibit oocyte nest breakdown and primordial follicle assembly in the neonatal mouse ovary *in vitro* and *in vivo*. **Endocrinology**, v. 148, p. 3580–3590, aug. 2007.

CLARKE, H. G.; HOPE, S. A.; BYERS, S.; RODGERS, R. J. Formation of ovarian follicular fluid may be due to the osmotic potential of large glycosaminoglycans and proteoglycans. **Reproduction**, v. 132, p. 119–131, jul. 2006.

DE BEM, A. R.; AMORIM, C. A.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. **Efeito do intervalo de corte do tecido ovariano no tissue chopper sobre o número de folículos pré-antrais isolados a partir de ovários de vacas nelore**. XII REUNIÃO ANUAL DA SBTE, Foz do Iguaçu-PR. Anais da XII Reunião Anual da SBTE, v. 25, p. 178-178, 1997.

DE ROBERTIS, E. M. F.; HIB, J. **Bases da Biologia celular e molecular**. 4ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 369, 2006.

DEMEESTERE, I.; SIMON, P.; ENGLERT, Y.; DELBAERE, A. Preliminary experience of ovarian tissue cryopreservation procedure: alternatives, perspectives and feasibility. **Reproductive BioMedicine Online**, v.7, p. 572–79, nov. 2003.

DONG, J.; ALBERTINI, D. F.; NISHIMORI, K.; KUMAR, T. R.; LU, N.; MATZUK, M. M. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. **Nature**, v. 383, p. 531–535, oct. 1996.

DUBE, J. L.; WANG, P.; ELVIN, J.; LYONS, K. M.; CELESTE, A. J.; MATZUK, M. M. The bone morphogenetic protein 15 gene is x-linked and expressed in oocytes. **Molecular Endocrinology**, v. 12, p. 1809-1817, dec. 1998.

DUFFY, D.M. Growth differentiation factor-9 is expressed by the primate follicle through the periovulatory interval. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 725–732, aug. 2003.

DURLINGER, A. L.; GRUIJTERS, M. J.; KRAMER, P.; KARELS, B.; INGRAHAM, H. A.; NACHTIGAL, M. W.; UILENBROEK, J. T.; GROOTEGOED, J. A.; THEMME, A. P. Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. **Endocrinology**, v. 143, p. 1076–1084, mar. 2002.

ELVIN, J. A.; CLARK, A. T.; WANG, P.; WOLFMAN, N. M.; MATZUK, M. M. Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. **Molecular Endocrinology**, v.13, p. 1035 - 1048, jun.1999a.

ELVIN, J. A.; YAN, C. N.; WANG, P.; NISHIMORI, K.; MATZUK, M. M. Molecular characterization of the follicle defects in the growth differentiation factor 9-deficient ovary. **Molecular Endocrinology**, v. 13, p. 1018– 1034. jun. 1999b.

ELVIN, J. A.; YAN, C.; MATZUK, M. M. Oocyte expressed TGF $\beta$  superfamily members in female fertility. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.159, p.1-5, jan. 2000.

ERIKSEN, G. V.; CARLSTEDT, I.; MORGELIN, M.; ULDBJERG, N.; MALMSTROM, A. Isolation and characterization of proteoglycans from human follicular fluid. **Biochemical Journal**, v. 340, p. 613–620, jun. 1999.

FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; SILVA, J. R. V. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. In: Gonçalves, P. B. D.; Figueiredo, J. R.; Freitas, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2ªed. São Paulo: Roca, p. 303-327. 2008.

FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 78 p. 135-163, oct. 2003.

FUJINO, K.; YAMASHITA, Y.; HAYASHI, A.; ASANO, M.; MORISHIMA, S.; OHMACHI, M. Survivin gene expression in granulosa cells from infertile patients undergoing *in vitro* fertilization-embryo transfer. **Fertility and Sterility**, v. 89, p. 60–65, jan. 2008.

FÜLOP, C.; SALUSTRI, A.; HASCALL, V. C. Coding Sequence of a Hyaluronan Synthase Homologue Expressed during Expansion of the Mouse Cumulus–Oocyte Complex. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 337, p. 261–266, jan. 1997.

GALLOWAY, S. M.; MCNATTY, K. P.; CAMBRIDGE, L. M.; LAITINEN, M. P. E.; JUENGEL, J. L.; JOKIRANTA, S.; MCLAREN, R. J.; LUIRO, K.; DODDS, K. G.; MONTGOMERY, G. W.; BEATTIE, A. E.; DAVIS, G. H.; RITVOS, O. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. **Nature Genetics**, v. 25, p. 279–283, jul. 2000.

GAN, L.; VAN SETTEN, G.; SEREGARD, S.; FAGERHOLM, P. Proliferating cell nuclear antigen colocalization with corneal epithelial stem cells and involvement in physiological cell turnover. **Acta Ophthalmol Scand**, v. 73, p. 491-495, dec. 1995.

GLISTER, C.; KEMP, C. F.; KNIGHT, P. G. Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells: actions of BMP-4, -6 and -7 on granulosa cells and differential modulation of Smad-1 phosphorylation by follistatin. **Reproduction**, v. 127, p. 239-254, feb. 2004.

GOSDEN, R. G.; HUNTER, R. H.; TELFER, E.; TORRANCE, C.; BROWN, N. Physiological factors underlying the formation of ovarian follicular fluid. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 82, p. 813–825, mar. 1988.

GOUGEON, A.; BUSSO, D. Morphologic and functional determinants of primordial and primary follicles in the monkey ovary. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 163, p. 33-41, may. 2000.

GU, Y.; RUNYAN, C.; SHOEMAKER, A.; SURANI, A.; WYLIE, C. Steel factor controls primordial germ cell survival and motility from the time of their specification in the allantois, and provides a continuous niche throughout their migration. **Development**, v. 136, p. 1295–1303, apr. 2009.

GULYAS, B. J.; HODGEN, G. D.; TULLNER, W. W.; ROSS, G. T. Effects of fetal or maternal hypophysectomy on endocrine organs and body weight in infant rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): with particular emphasis on oogenesis. **Biology of Reproduction**, v. 16, p. 216–227, 1977.

GUPTA, P. S. P.; RAMESH, H. S.; MANJUNATHA, B. M.; NANDI, S.; RAVINDRA, J. P. Production of buffalo embryos using oocytes from *in vitro* grown preantral follicles. **Zygote**, v. 16, p. 57-63, feb. 2008.

GUTIERREZ, C. G.; RALPH, J. H.; TELFER, E. E.; WILMUT, I.; WEBB, R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 62, p.1322-1328, 2000.

H Aidari, K.; SALEHNIA, M.; VALOJERDI, M. R. The effect of leukemia inhibitory factor and co-culture on the *in vitro* maturation and ultrastructure of vitrified isolated mouse preantral follicles. **Fertility and Sterility**, v. 90, p. 2389–97, dec. 2008.

HALM, S.; IBÁÑEZ, A. J.; TYLER, C. R.; PRAT, F. Molecular characterisation of growth differentiation factor 9 (gdf9) and bone morphogenetic protein 15 (bmp15) and their patterns of gene expression during the ovarian reproductive cycle in the European sea bass. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 291, p. 95–103, sep. 2008.

HALPIN, D. M.; JONES, A.; FINK, G.; CHARLTON, H. M. Postnatal ovarian follicle development in hypogonadal (hpg) and normal mice and associated changes in the hypothalamic-pituitary ovarian axis. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 77, p. 287–296, may. 1986.

HARTSHORNE, G. M. *In vitro* culture of ovarian follicles. **Reviews of Reproduction**, v. 2, p. 94-104, 1997.

HATA, A.; LAGNA, G.; MASSAGUE, J.; HEMMATI-BRIVANLOU, A. Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. **Genes & Development**, v. 12, p. 186–197, jan. 1998.

HAYASHI, M.; MCGEE, E. A.; MIN, G.; KLEIN, C.; ROSE, U. M.; VAN DUIN, M.; HSUEH, A. J. Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and



differentiation of cultured early ovarian follicles. **Endocrinology**, v. 140, p. 1236–1244, mar. 1999.

HILLIER, S. G. Current concepts the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis. **Human Reproduction**, v. 9, p. 188–191, 1994.

HIRSHFIELD, A. N. Development of follicles in the mammalian ovary. **International Review of Cytology**, v. 124, p. 43-101, 1991.

HONDA, A.; HIROSE, M.; HARA, K.; MATOBA, S.; INOUE, K.; MIKI, H.; HIURA, H.; KANATSU-SHINOHARAM, KANAI Y, KONO T. Isolation, characterization, and *in vitro* and *in vivo* differentiation of putative thecal stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, p. 12389–12394, jul. 2007.

HREINSSON, J. G.; SCOTT, J. E.; RASMUSSEN, C.; SWAHN, M. L.; HSUEH, A. J.; HOVATTA, O. Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 87, p. 316-321, jan. 2002.

HSU, D. R.; ECONOMIDES, A. N.; WANG, X.; EIMON, P. M.; HARLAND, R. M. The *Xenopus* dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities. **Molecular Cell**, v. 1, p. 673–683, apr. 1998.

HULSHOF, S. C. J.; FIGUEIREDO, J. R.; BECKERS, J. F.; BEVERS, M. M.; VAN DER DONK, J. A. Effects of fetal bovine serum, FSH and 17 $\beta$ -estradiol on the culture of bovine preantral follicles. **Theriogenology**, v. 44, p. 217-226, jul. 1995.

HULSHOF, S. C. J.; FIGUEIREDO, J. R.; BECKERS, J. F.; BEVERS, M. M.; VANDERSTICHELE, H.; VAN DEN HURK, R. Bovine preantral follicles and activin: immunohistochemistry for activin and activin receptor and the effect of bovine activin A *in vitro*. **Theriogenology**, v. 48, p. 133–142, jul. 1997.

HUNZICKER-DUNN, M.; MAIZELS. FSH signaling pathways in immature granulosa cells that regulate target gene expression: branching out from protein kinase A. **Cell Signaling**, v. 18, p. 1351-9, 2006.

HUSSEIN, M. R. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. **Human Reproduction Update**, v. 11, p. 162-178, mar. 2005.

IRVING-RODGERS, H. F.; HARLAND, M. L.; RODGERS, R. J. A novel basal lamina matrix of the stratified epithelium of the ovarian follicle. **Matrix Biology**, v. 23, p. 207–217, jul. 2004.

ISHIHARA, H.; WARENSJO, K.; ROBERTS, S.; URBAN, J. P. Proteoglycan synthesis in the intervertebral disk nucleus: the role of extracellular osmolality. **American Journal of Physiology**, v. 272, p. 1499–1506, may. 1997.

ITOH, T.; KACCHI, M.; ABE, H.; SENDAI, Y.; HOSHI, H. Growth, antrum formation, and estradiol production of bovine preantral follicles cultured in a serum-free medium. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1099-1105, oct. 2002.

JAATINEN, R.; LAITINEN, M. P.; VUOJOLAINEN, K.; AALTONEN, J.; LOUHIO, H.; HEIKINHEIMO, K.; LEHTONEN, E.; RITVOS, O. Localization of growth differentiation factor-9 (GDF-9) mRNA and protein in rat ovaries and cDNA cloning of rat GDF-9 and its novel homolog GDF-9B. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 156, p. 189–193, oct. 1999.

JEWGENOW, K. Impact of peptide growth factors on the culture of small preantral follicles of domestic cats. **Theriogenology**, v. 45, p. 889-895, mar. 1996.

JOHN, G. B.; SHIRLEY, L. J.; GALLARDO, T. D.; CASTRILLON, D. H. Specificity of the requirement for Foxo3 in primordial follicle activation. **Reproduction**, v. 133 p. 855–863, may. 2007.

JOHNSON, A. L. Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 185–201, oct. 2003.

JOHNSON, A. L.; BRIDGHAM, J. T. Caspase-mediated apoptosis in the vertebrate ovary. **Reproduction**, v. 124, p. 19–27, jul. 2002.

JOSHI, S.; DAVIES, H.; SIMS, L. P.; LEVY, S. E.; DEAN, J. Ovarian gene expression in the absence of FIGLA, an oocyte-specific transcription factor. **BMC Developmental Biology**, v. 7, p. 67, 2007.

JOYCE, I. M.; PENDOLA, F. L.; WIGGLESWORTH, K.; EPPIG, J. J. Oocyte regulation of Kit ligand expression in mouse ovarian follicles. **Developmental Biology**, v. 214, p. 342–53, oct. 1999.

JUENGEL, J. L.; HUDSON, N. L.; HEATH, D. A.; SMITH, P.; READER, K. L.; LAWRENCE, S. B.; O'CONNELL, A. R.; LAITINEN, M. P. E.; CRANFIELD, M.; GROOME, N. P.; RITVOS, O.; McNATTY, K. P. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1777–1789, dec. 2002.

JUENGEL, J. L.; McNATTY, K. P. The role of proteins of the transforming growth factor-beta superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. **Human Reproduction Update**, v. 11, p. 143-160, mar. 2005.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 8<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 332, 2005.

KEDEM, A.; FISCH, B.; GAROR, R.; BEN-ZAKEN, A.; GIZUNTERMAN, T.; FELZ, C.; BEN-HAROUSH, A.; KRAVARUSIC, D.; ABIR, R. Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15)/Growth Differentiating Factor 9 heterodimer is more potent than BMP15 alone in *in vitro*. **Activation of Human Primordial Follicles**, feb. 2011. doi: 10.1210/jc.2010-1749.

KIM, J.; CHU, J.; SHEN, X.; WANG, J.; ORKIN, S.H. An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells. **Cell**, v. 132, p. 1049-1061, jun. 2008.

KNIGHT, P. G.; GLISTER, C. TGF- $\beta$  superfamily members and ovarian follicle development. **Reproduction**, v. 132, p. 191-206, ago. 2006.

KOSHIMIZU, U.; WATANABE, M.; NAKATSUJI, N. Retinoic acid is a potent growth activator of mouse primordial germ cells *in vitro*. **Developmental Biology**, v. 168, p. 683-685, apr. 1995.

KOVACH, IS. The importance of polysaccharide configurational entropy in determining the osmotic swelling pressure of concentrated proteoglycan solution and the bulk compressive modulus of articular cartilage. **Biophysical Chemistry**, v. 53, p. 181–187, feb. 1995.

KUGU, K.; RATTIS, V. S.; PIQUETTE, G. N.; TILLY, K. I.; TAO, X. J.; MARTIMBEAU, S.; ABERDEEN, G. W.; KRAJEWSKI, S.; REED, J. C.; PEPE, G. J. Analysis of apoptosis and expression of bcl-2 gene family members in the human and baboon ovary. **Cell Death & Differentiation**, v. 5, p. 67–76, jan. 1998.

LAN, Z. J.; XU, X.; COONEY A. J. Differential oocyte-specific expression of Cre recombinase activity in GDF-9-iCre, Zp3cre, and Msx2Cre transgenic mice. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 1469–1474, nov. 2004.

LAWSON, K. A.; DUNN, N. R.; ROELEN, B. A.; ZEINSTRA, L. M.; DAVIS, A. M.; WRIGHT, C. V.; KORVING, J. P.; HOGAN, B. L. BMP4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. **Genes & Development**, v. 13, p. 424–436, feb. 1999.

LEE, V. H. Expression of rabbit zona pellucida-1 messenger ribonucleic acid during early follicular development. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 401, aug. 2000.

LEE, W. S.; YOON, S. J.; YOON, T. K.; CHA, K. Y.; LEE, S. H.; SHIMASAKI, S.; LEE, S.; LEE, K. A. Effects of bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) on primordial follicular growth in the mouse ovary. **Molecular Reproduction and Development**, v. 69, p. 159-163, oct. 2004.

LEJONA, D. S.; BENETTI, M. S.; FAY, F.; FAY, O. Avances en el Diagnóstico Molecular: reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. **Anuario Fundación Dr. J. R. Villavicencio**, v. 14, p. 033 – 037, 2006.

LEMIRE, J. M.; MERRILEES, M. J.; BRAUN, K. R.; WIGHT, T. N. Overexpression of the V3 variant of versican alters arterial smooth muscle cell adhesion, migration, and proliferation *in vitro*. **Journal of Cellular Physiology**, v. 190, p. 38–45, jan. 2002.

LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H. T.; SARAIVA, M. V. A.; BRUNO, J. B.; TENÓRIO, S. B.; MARTINS, F. S.; CUNHA, L. D.; NAME, K.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Interaction between estradiol and follicle-stimulating hormone promotes *in vitro* survival and development of caprine preantral follicles E2 and FSH in the culture of goat preantral follicles. **Cells. Tissues Organs**, v. 191, p. 240-247, jul. 2010.

LIVAK, K. J. and SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $-2\Delta\Delta CT$  method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

LIU, K.; RAJAREDDY, S.; LIU, L.; JAGARLAMUDI, K.; BOMAN, K.; SELSTAM, G.; REDDY, P. Control of mammalian oocyte growth and early follicular development by the

oocyte PI3 kinase pathway: New roles for an old timer. **Developmental Biology**, v. 299, p. 1–11, nov. 2006.

LIU, L.; RAJAREDDY, S.; REDDY, P.; DU, C.; JAGARLAMUDI, K.; SHEN, Y.; GUNNARSSON, D.; SELSTAM, G.; BOMAN, K.; LIU, K. Infertility caused by retardation of follicular development in mice with oocyte-specific expression of Foxo3a. **Development**, v. 134, p. 199–209, jan. 2007.

LIU, X.; ANDOH, K.; ABE, Y.; KOBAYASHI, J.; YAMADA, K.; MIZUNUMA, H.; IBUKI, Y. A comparative study on transforming growth factor- $\beta$  and activin A for preantral follicles from adult, immature, and diethylstilbestrol-primed immature mice. **Endocrinology**, v. 140, p. 2480–2485, jun. 1999.

LIU, X.; ANDOH, K.; YOKOTA, H.; KOBAYASHI, J.; ABE, Y.; YAMADA, K.; MIZUNUMA, H.; IBUKI, Y. Effects of growth hormone, activin, and follistatin on the development of preantral follicle from immature female mice. **Endocrinology**, v. 139, p. 2342–2347, may. 1998.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $^{-2\Delta\Delta}$ CT method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

LOPES, C. A. P.; SANTOS, R. R.; CELESTINO, J. J. H.; MELO, M. A.; CHAVES, R. N.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R.; BÁO, S. N.; JEWGENOW, K.; FIGUEIREDO, J. R. Short-term preservation of canine preantral follicles: Effects of temperature, medium and time. **Animal Reproduction Science**, v. 115, p. 201–14, oct. 2009.

MAGALHÃES, D. M.; ARAÚJO, V. R.; LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H. T.; SILVA, R. C.; LUCCI, C. M.; BÁO, S. N.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Different Follicle-Stimulating Hormone (FSH) sources influence caprine preantral follicle viability and development *in vitro*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, n. 5, p. 378–386, aug. 2009a.

MAGALHÃES, D. M.; ARAÚJO, V. R.; LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H.; SILVA, R. C.; LUCCI, C. M.; BÁO, S. N.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Impact of pituitary FSH purification on *in vitro* early folliculogenesis in goats. **Biocell**, v. 33, p. 91–97, aug. 2009b.

MAGALHÃES, D. M.; DUARTE, A. B.; ARAÚJO, V. R.; BRITO, I. R.; SOARES, T. G.; LIMA, I. M.; LOPES, C. A.; CAMPELLO, C. C.; RODRIGUES, A. P.; FIGUEIREDO, J. R. *In vitro* production of a caprine embryo from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone. **Theriogenology**, v. 75, p. 182–188, jan. 2011a.

MAGALHÃES, D. M.; FERNANDES, D. D.; MORORÓ, M. B. R.; SILVA, C. M. G.; RODRIGUES, G. Q.; BRUNO, J. B.; MATOS, M. H. T.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Effect of the medium replacement interval on the viability, growth and *in vitro* maturation of isolated caprine and ovine pre-antral follicles. **Reproduction Domestic Animals**, v. 46, p. 134–140, feb. 2011b.

MAGOFFIN, D. A. Ovarian theca cell. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, p. 1344–9, jul. 2005.

MAGOFFIN, D. A.; WEITSMAN, S. R. Insulin-like growth factor-I regulation of luteinizing hormone (LH) receptor messenger ribonucleic acid expression and LH-stimulated signal transduction in rat ovarian thecainterstitial cells. **Biology of Reproduction**, v. 51 p. 766-775, oct. 1994.

MAO, J.; WU, G.; SMITH, M. F.; MCCAULEY, T. C.; CANTLEY, T. C.; PRATHER, R. S.; DIDION, B. A.; DAY, B. N. Effects of culture medium, serum type, and various concentrations of follicle-stimulating hormone on porcine preantral follicular development and antrum formation *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1197–1203, oct. 2002.

MARKSTROM, E.; SVENSSON, E. C. H.; SHAO, R.; SVANBERG, B.; BILLIG, H. Survival factors regulating ovarian apoptosis - dependence on follicle differentiation **Reproduction**, v. 123, p. 23-30, jan. 2002.

MARTINS, F. S. **Papel do GDF-9, IGF-I e GH sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos**. 2009. 215f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, 2009.

MARTINS, F. S.; CELESTINO, J. J. H.; SARAIVA, M. V. A.; MATOS, M. H. T.; BRUNO, J. B.; ROCHA-JUNIOR, C. M. C.; LIMA-VERDE, I. B.; LUCCI, C. M.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Growth and differentiation factor-9 stimulates activation of goat primordial follicles *in vitro* and their progression to secondary follicles. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, p. 916–924, 2008.

MATOS, M. H. T.; ANDRADE, E. R.; LUCCI, C. M.; BÁO, S. N.; SILVA, J. R. V.; SANTOS, R. R.; FERREIRA, M. A. L.; COSTA, S. H. F.; CELESTINO, J. J. H.; FIGUEIREDO, J. R. Morphological and ultrastructural analysis of sheep primordial follicles preserved in 0.9% saline solution and TCM 199. **Theriogenology**, v. 62, p. 65-80, jul. 2004.

MATOS, M. H. T.; LIMA-VERDE, I. B.; LUQUE, M. C. A.; MAIA JR, J. E.; SILVA, J. R. V.; CELESTINO, J. J. H.; MARTINS, F. S.; BÁO, S. N.; LUCCI, C. M.; FIGUEIREDO, J. R. Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability *in vitro*. **Zygote**, v. 15, p. 173-182, may. 2007.

MAZERBOURG, S.; KLEIN, C.; ROH, J.; KAIVO-OJA, N.; MOTTERSHEAD, D. G.; KORCHYNSKYI, O.; RITVOS, O.; HSUEH, A. J. Growth differentiation factor-9 (GDF-9) signalling is mediated by the type 1 receptor ALK5. **Molecular Endocrinology**, v. 18, p. 653–655, mar. 2004.

McARTHUR, M. E.; IRVING-RODGERS, H. F.; BYERS, S.; RODGERS, R. J. Identification and immunolocalization of decorin, versican, perlecan, nidogen, and chondroitin sulfate proteoglycans in bovine small-antral ovarian follicles. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 913–924, sep. 2000.

McGEE, E. A.; HSUEH, A. J. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. **Endocrine Reviews**, v. 21, p. 200–214, apr. 2000.

McGEE, E. A.; PERLAS, E.; LAPOLT, P. S.; TSAFRIRI, A.; HSUEH, A. J. Follicle-stimulating hormone enhances the development of preantral follicles in juvenile rats. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 990-998, nov. 1997a.

McGEE, E.; SPEARS, N.; MINAMI, S.; HSU, S.-Y.; CHUN, S.-Y.; BILLIG, H.; HSUEH, A. J. W. Preantral ovarian follicles in serum-free culture: suppression of apoptosis after activation of the cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate pathway and stimulation of growth and differentiation by follicle-stimulating hormone. **Endocrinology**, v. 138, p. 2417-2424, jun. 1997b.

McLAUGHLIN, E. A.; MCIVER, S. C. Awakening the oocyte: controlling primordial follicle development. **Reproduction**, v. 137, p. 1-11, jan. 2009.

McLAUGHLIN, M.; TELFER, E. Oocyte development in bovine primordial follicles is promoted by activin and FSH within a two-step serum-free culture system. **Reproduction**, v. 139, p. 971-978, jun. 2010.

McNATTY, K. P.; FIDLER, A. E.; JUENGEL, J. L.; QUIRKE, L. D.; SMITH, P. R.; HEATH, D. A.; LUNDY, T.; O'CONNELL, A.; TISDALL, D. J. Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 163, p. 11-20, may. 2000.

McPHERRON, A. C.; LEE, S. J. GDF-3 and GDF-9: two new members of the transforming growth factor-beta superfamily containing a novel pattern of cysteines. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 3444-3449, feb. 1993.

MENKE, D. B.; KOUBOVA, J.; PAGE, D. C. Sexual differentiation of germ cells in XX mouse gonads occurs in an anterior-to-posterior wave. **Developmental Biology**, v. 262, p. 303-312, oct. 2003.

MINJ, A.; MONDAL, S.; TIWARI, A. K.; SHARMA, B.; VARSHNEY, V. P. Molecular characterization of follicle stimulating hormone receptor (FSHR) gene in the Indian river buffalo (*Bubalus bubalis*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 158, p. 147-153, sep. 2008.

MORITA, Y.; TILLY, J. L. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. **Developmental Biology**, v. 213, p. 1-17, sep. 1999.

NILSSON, E. E.; PARROTT, J. A.; SKINNER, M. K. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 175, p. 123-130, apr. 2001.

NILSSON, E. E.; SKINNER, M. K. Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 1265-1272, oct. 2003.

NILSSON, E. E.; SKINNER, M. K. Growth and differentiation factor-9 stimulates progression of early primary but not primordial rat ovarian follicle development. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1018-1024, sep. 2002.

NILSSON, E. E.; SKINNER, M. K. Kit ligand and basic fibroblast growth factor interactions in the induction of ovarian primordial to primary follicle transition. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 214, p. 19-25, feb. 2004.

NUTTINCK, F.; COLLETTE, L.; MASSIP, A.; DESSY, F. Histologic and autoradiographic study of the *in vitro* effects of FGF-2 and FSH on isolated bovine preantral follicles: preliminary investigation. **Theriogenology**, v. 45, p. 1235-1245, apr. 1996.

O'BRIEN, M. J.; PENDOLA, J. K.; EPPIG, J. J. A revised protocol for *in vitro* development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their development competence. **Biology of Reproduction**, v. 8, p. 1682-1686, may. 2003.

OKTAY, K.; NUGENT, D.; NEWTON, H.; SALHA, O.; CHATTERJEE, P.; GOSDEN, R. G. Isolation and characterization of primordial follicles from fresh and cryopreserved human ovarian tissue. **Fertility and Sterility**, v. 67, p. 481-486, mar. 1997.

ORISAKA, M.; ORISAKA, S.; JIANG, J.; CRAIG, J.; WANG, Y.; KOTSUJI, F.; TSANG, B. K. Growth Differentiation Factor 9 is antiapoptotic during follicular development from preantral to early antral stage. **Molecular Endocrinology**, v. 20, p. 2456-2468, oct. 2006.

PADANILAM, B. J. Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. **American Journal Physiology of Renal**, v. 284, p. 608-627, apr. 2003.

PANGAS, S. A.; JORGEZ, C. J.; MATZUK, M. M. Growth Differentiation Factor 9 Regulates Expression of the Bone Morphogenetic Protein Antagonist Gremlin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 32281-32286, jul. 2004.

PARROTT, J. A.; SKINNER, M. K. Direct actions of kit-ligand on theca cell growth and differentiation during follicle development. **Endocrinology**, v. 138, p. 3819-3827, sep. 1997.

PARROTT, J. A.; VIGNE, J. L.; CHU, B. Z.; SKINNER, M. K. Mesenchymal-epithelial interactions in the ovarian follicle involve keratinocyte and hepatocyte growth factor production by thecal cells and their action on granulosa cells. **Endocrinology**, v. 135, p. 569-575, aug. 1994.

PENNETIER, S.; UZBEKOVA, S.; PERREAU, C.; PAPILLIER, P.; MERMILLOD, P.; DALBIES-TRAN, R. Spatio-temporal expression of the germ cell marker genes *MATER*, *ZAR1*, *GDF9*, *BMP15*, and *VASA* in adult bovine tissues, oocytes, and preimplantation embryos. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 1359-1366, out. 2004.

PEPLING, M. E.; SPRADLING, A. C. Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. **Developmental Biology**, v. 234, p. 339-351, jun. 2001.

PRINCIVALLE, M.; HASAN, S.; HOSSEINI, G.; AGOSTINI, A. I. Anticoagulant heparan sulfate proteoglycans expression in the rat ovary peaks in preovulatory granulosa cells. **Glycobiology**, v. 11, p. 183-194, mar. 2001.

QIN CHEN, A.; YU, S. D.; WANG, Z. G.; XU, Z. R.; YANG, Z. G. Stage-specific expression of bone morphogenetic protein type I and type II receptor genes: effects of follicle-stimulating hormone on ovine antral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 111, p. 391-399, apr. 2009.

RAHMANI, M.; WONG, B. W.; ANG, L.; CHEUNG, C. C.; CARTHY, J. M.; WALINSKI, H.; MCMANUS, B. M. Versican: signaling to transcriptional control pathways. **Canadian Journal Physiology Pharmacology**, v. 84, p. 77–92, jan. 2006.

RANKIN, T. L.; O'BRIEN, M.; LEE, E.; WIGGLESWORTH, K.; EPPIG, J.; DEAN, J. Defective zona pellucidae in Zp2-null mice disrupt folliculogenesis, fertility and development. **Development**, v. 128, p. 1119-1126, apr. 2001.

RAVINDRANATH, N.; LITTLE-IHRIG, L.; PHILLIPS, H. S.; FERRARA, N.; ZELEZNIK, A. J. Vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid expression in the primate ovary. **Endocrinology**, v. 131, p. 254–260, jul. 1992.

REBOUÇAS, E. L. **Estabilidade de genes de referência e quantificação de RNAs mensageiros para os fatores de crescimento semelhante à insulina (IGF), seus receptores e proteínas de ligação ao IGF (IGFBPs) em folículos ovarianos bovinos.** 2011. 123f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Ceará, Sobral, CE, 2011.

REDDY, P.; LIU, L.; ADHIKARI, D.; JAGARLAMUDI, K.; RAJAREDDY, S.; SHEN, Y.; DU, C.; TANG, W.; HAMALAINEN, T.; PENG, S. L. Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. **Science**, v. 319, p. 611–613, feb. 2008.

REDDY, P.; ADHIKARI, D.; ZHENG, W.; LIANG, S.; HAMALAINEN, T.; TOHONEN, V.; OGAWA, W.; NODA, T.; VOLAREVIC, S.; HUHTANIEMI, I.; LIU, K. PDK1 signaling in oocytes controls reproductive aging and lifespan by manipulating the survival of primordial follicles. **Human Molecular Genetics**, v. 18, p. 2813-2824, aug. 2009a.

REDDY, P.; SHEN, L.; REN, C.; BOMAN, K.; LUNDIN, E.; OTTANDER, U.; LINDGREN, P.; LIU, Y. X.; SUN, Q. Y.; LIU, K. Activation of Akt (PKB) and suppression of FKHL1 in mouse and rat oocytes by stem cell factor during follicular activation and development. **Developmental Biology**, v. 2, p. 160-170, may. 2005.

REDDY, P.; ZHENG, W.; LIU, K. Mechanisms maintaining the dormancy and survival of mammalian primordial follicles. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.21, p. 96-103, feb. 2009b.

REDMER, D. A.; DORAISWAMY, V.; BORTNEM, B. J.; FISHER, K.; JABLONKA-SHARIFF, A.; GRAZUL-BILSKA, A. T.; REYNOLDS, L. P. Evidence for a role of capillary pericytes in vascular growth of the developing ovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 879–889, sep. 2001.

RODGERS, R. J.; IRVING-RODGERS, H. F. Formation of the Ovarian Follicular Antrum and Follicular Fluid. **Biology of Reproduction**, v. 82, p. 1021–1029, jun. 2010.

ROMANO, M.; KRAUS, E. R.; BOLAND, C. R.; COFFEY, R. J. Comparison between transforming growth factor alpha and epidermal growth factor in the protection of rat gastric mucosa against drug-induced injury. **The Italian Journal of Gastroenterology**, v. 26, p. 223-228, jun. 1994.



- ROSSETTO, R.; LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H. T.; SARAIVA, M. V. A.; MARTINS, F. S.; FAUSTINO, L. R.; ARAÚJO, V. R.; SILVA, C. M. G.; NAME, K. P. O.; BÁO, S. N.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R.; BLUME, H. Interaction between ascorbic acid and follicle-stimulating hormone maintains follicular viability after long-term *in vitro* culture of caprine preantral follicles. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 37, p. 112-123, aug. 2009.
- ROY, S. K.; KOLE, A. R. Ovarian transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptors: *in vitro* effects of follicle stimulating hormone, epidermal growth factor and TGF beta on receptor expression in human preantral follicles. **Molecular Human Reproduction**, v. 4, p. 207-214, mar. 1998.
- RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibliotheca Anatômica**, v. 24, p. 77-92, 1983.
- SADEU, C.; SMITZ, J. Growth differentiation factor-9 and anti-müllerian hormone expression in cultured human follicles from frozen-thawed ovarian tissue. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 17, p. 537-548, oct. 2008.
- SARAIVA, M. V. A.; CELESTINO, J. J. H.; ARAÚJO, V. R.; CHAVES, R. N.; ALMEIDA, A. P.; LIMA-VERDE, I. B.; DUARTE, A. B. G.; SILVA, G. M.; MARTINS, F. S.; BRUNO, J. B.; MATOS, M. H. T.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Expression of follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) in goat ovarian follicles and the impact of sequential culture medium on *in vitro* development of caprine preantral follicles. **Zygote**, v. 19, p. 205-214, aug. 2011.
- SARAIVA, M. V. A.; ROSSETTO, R.; BRITO, I. R.; CELESTINO, J. J.; SILVA, C. M.; FAUSTINO, L. R.; ALMEIDA, A. P.; BRUNO, J. B.; MAGALHÃES, D. M.; MATOS, M. H.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Dynamic medium produces caprine embryo from preantral follicles grown *in vitro*. **Reproduction Science**, v. 17, p. 1135-1143, dec. 2010.
- SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovascular Research**, v. 45, p. 528-37, feb. 2000.
- SATHANANTHAN, A. H.; SELVARAJ, K.; TROUNSON, A. Fine structure of human oogonia in the foetal ovary. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 161, p. 3-8, mar. 2000.
- SAUMANDE, J. La folliculogénese chez les ruminants. **Recueil in Médecine Vétérinaire**, v. 167, p.205-218, 1991.
- SAWYER, H. T.; SMITH, P.; HEATH, D. A.; JUENGEL, J. L.; WAKEFIELD, S. J.; MCNATTY, K. P. Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 1134-1150, apr. 2002.
- SCHOENFELDER, M.; EINSPANIER, R. Expression of hyaluronan synthases and corresponding hyaluronan receptors is differentially regulated during oocyte maturation in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 269-277, jul. 2003.

SENEDA, M. M.; BORDIGNON, V. New concepts on folliculogenesis. **Acta Science Veterinarie**, v. 35, p. 863-868, 2007.

SERAFIM, M. K.; ARAÚJO, V. R.; SILVA, G. M.; DUARTE, A. B.; ALMEIDA, A. P.; CHAVES, R. N.; CAMPELLO, C. C.; LOPES, C. A.; FIGUEIREDO, J. R.; DA SILVA, L. D. Canine preantral follicles cultured with various concentrations of follicle-stimulating hormone (FSH). **Theriogenology**, v. 74, p. 749-755, sep. 2010.

SILVA, C. M. G.; MATOS, M. H. T.; RODRIGUES, G. Q.; FAUSTINO, L. R.; PINTO, L. C.; CHAVES, R. N.; ARAÚJO, V. R.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. *In vitro* survival and development of goat preantral follicles in two different oxygen tensions. **Animal Reproduction Science**, v. 117, p. 83-89, jan. 2010.

SILVA, J. R. V.; THARASANIT, T.; TAVERNE, M. A. M.; VAN DER WEIJDEN, G.C.; SANTOS R.R., FIGUEIREDO J.R.; VAN DEN HURK R. The activin-follistatin system and *in vitro* early follicle development in goats. **Journal of Endocrinology**, v. 189, p. 113-125, apr. 2006.

SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R. V. D.; VAN TOL, H. T.; ROELEN, B. A. J.; FIGUEIREDO, J. R. Expression of growth differentiation factor 9 (GDF9), bone morphogenetic protein 15 (BMP15), and BMP receptors in the ovaries of goats. **Molecular Reproduction and Development**, v. 70, p.11-19, jan. 2005.

SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R.; MATOS, M. H. T.; SANTOS, R. R.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; FIGUEIREDO, J. R. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during *in vitro* culture of caprine ovarian cortical tissue. **Theriogenology**, v. 61, p. 1691-1704, jun. 2004.

SKINNER, M. K. Regulation of primordial follicle assembly and development. **Human Reproduction Update**, v. 11, p. 461-471, sep. 2005.

SLOT, K. A.; VOORENDT, M.; DE BOER-BROUWER, M.; VAN VUGT, H. H.; TEERDS, K. J. Estrous cycle dependent changes in expression and distribution of Fas, Fas ligand, Bcl-2, Bax, and pro- and active caspase-3 in the rat ovary. **Journal of Endocrinology**, v. 188, p. 179-192, feb. 2006.

SMITZ, J.; CORTVRINDT, R.; HU, Y.; VANDERSTICHELE, H. Effects of recombinant activin A on *in vitro* culture of mouse preantral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v. 50, p. 294-304, jul. 1998.

SOLOVYEVA, E. V.; HAYASHI, M.; MARGI, K.; BARKATS, C.; KLEIN, C.; AMSTERDAM, A.; HSUEH, A. J.; TSAFRIRI, A. Growth differentiation factor-9 stimulates rat theca-interstitial cell androgen biosynthesis. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 1214 - 1218, oct. 2000.

SPEARS, N.; MURRAY, A. A.; ALISSON, V.; BOLAND, N. I.; GOSDEN, R. G. Role of gonadotrofins and ovarian steroids in the development of mouse follicles *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 113, p. 19-26, may. 1998.

SPICER, L. J.; AAD, P. Y.; ALLEN, D. T.; MAZERBOURG, S.; PAYNE, A. H.; HSUEH, A. J. Growth differentiation factor 9 (GDF9) stimulates proliferation and inhibits steroidogenesis by bovine theca cells: Influence of follicle size on responses to GDF9. **Biology of Reproduction**, v. 78, p. 243–253, feb. 2008.

SPICER, L. J.; AAD, P. Y.; ALLEN, D.; MAZERBOURG, S.; HSUEH, A. J. Growth differentiation factor-9 has divergent effects on proliferation and steroidogenesis of bovine granulosa cells. **Journal of Endocrinology**, v. 189, p. 329-39, may. 2006.

TAYLOR, P. D.; HILLIER, S. G.; FRASER, H. M. Effects of GnRH antagonist treatment on follicular development and angiogenesis in the primate ovary. **Journal of Endocrinology**, v. 183, p. 1–17, jul. 2004.

TELFER, E. E. *In vitro* development of pig preantral follicles. **Reproduction**, v. 58, p. 81–90, 2001.

TELFER, E. E. *In vitro* models for oocyte development. **Theriogenology**, v. 15, p. 451-60, jan. 1998.

TEN DIJKE, P.; MIYAZONO, K.; HELDIN, C. H. Signaling inputs converge on nuclear effectors in TGF- $\beta$  signaling. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 25, p. 64-70, feb. 2000.

THOMAS, F. H.; ARMSTRONG, D. G.; TELFER, E. E. Activin promotes oocyte development in ovine preantral follicles *in vitro*. **Reproduction Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 1-7, nov. 2003.

THOMAS, F. H.; ETHIER, J. F.; SHIMASAKI, S.; VANDERHYDEN, B. C. Follicle stimulating hormone regulates oocyte growth by modulation of expression of oocyte and granulosa cell factors. **Endocrinology**, v. 146, p. 941-949, feb. 2005.

TINGEN, C.; KIM, A.; WOODRUFF, T. K. The primordial pool of follicles and nest breakdown in mammalian ovaries. **Molecular Human Reproduction**, v. 15, p. 795–803, aug. 2009.

TROUNSON, A.; GUNN, I.; LACHAM-KAPLAN, O.; LEWIS, I.; MCKINNON, A.; PEURA, T.; SHAW, J. **Manipulation of development: Opportunities for animal breeding**. In: Lauria, A., Gandolfi, F., Enne, G. and Gianaroli, L. (eds) *Gametes: Development and Function*. Serono Symposia, 1998.

ULLOA-AGUIRRE, A.; MIDGLEY JR., A. R.; BEITINS, I. Z.; PADMANABHAN, V. Follicle-stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. **Endocrine Reviews**, v. 16, p. 765–787, dec. 1995.

VAN DEN HURK, R.; ABRIR, R.; TELFER, E. E.; BEVERES, M. M. Primate and bovine immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes. **Human Reproduction Update**, v. 6, p. 457-474, sep. 2000.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, p. 1717–1751, apr. 2005.

VAN WEZEL, I.; RODGERS, R. J. Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment *in vivo*. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1003-1011, 1996.

VERNON, R. K.; SPICER, L. J. Effects of basic fibroblast growth factor and heparin on follicle-stimulating hormone-induced steroidogenesis by bovine granulosa cells. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 2696-2702, oct. 1994.

VITT, U. A.; HAYASHI, M.; KLEIN, C.; HSUEH, A. J. Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 370-377, feb. 2000b.

VITT, U. A.; MAZERBOURG, S.; KLEIN, C.; HSUEH, A. J. W. Bone morphogenetic protein receptor type II is a receptor for growth differentiation factor-9. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 473-480, aug. 2002.

VITT, U. A.; MCGEE, E. A.; HAYASHI, M.; HSUEH, A. J. W. *In vivo* treatment with GDF-9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats. **Endocrinology**, v. 141, p. 3814-3820, oct. 2000a.

WANDJI, S. A.; EPPIG, J. J.; FORTUNE, J. E. FSH and Growth Factors Affect the Growth and Endocrine Function *in vitro* of Granulosa Cells of Bovine Preantral Follicles. **Theriogenology**, v. 45, p. 817-832, mar. 1996.

WANDJI, S. A.; PELLETIER, G.; SIRARD, M. A. Ontogeny and cellular localization of 125I-labeled basic fibroblast growth factor and 125I-labeled epidermal growth factor binding sites in ovaries from bovine fetuses and neonatal calves. **Biology of Reproduction**, v. 47, p. 807-813, nov. 1992.

WANG, C.; PROSSNITZ, E. R.; ROY, S. K. G Protein-Coupled receptor 30 expression is required for estrogen stimulation of primordial follicle formation in the hamster ovary. **Endocrinology**, v. 149, p. 4452-4461, sep. 2008.

WANG, C.; ROY, S. K. Expression of E-Cadherin and N-Cadherin in perinatal hamster ovary: Possible involvement in primordial follicle formation and regulation by follicle-stimulating hormone. **Endocrinology**, v. 151, p. 2319-2330, may. 2010.

WANG, C.; ROY, S. K. Expression of Growth Differentiation Factor 9 in the Oocytes Is Essential for the Development of Primordial Follicles in the Hamster Ovary. **Endocrinology**, v. 147, p. 1725-1734, apr. 2006.

WANG, J.; ROY, S. K. Growth differentiation factor-9 and stem cell factor promote primordial follicle formation in the hamster: modulation by follicle-stimulating hormone. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 577-585, mar. 2004.

WRIGHT, C.S.; HOVATTA, O.; MARGARA, R.; TREW, G.; WINSTON, R. M. L.; FRANKS, S.; HARDY, K. Effects of follicle-stimulating hormone and serum substitution on the in-vitro growth of human ovarian follicles. **Human Reproduction**, v. 14, p. 1555-1562, jun. 1999.

WU, J.; NAYUDU, P. L.; KIESEL, P. S.; MICHELMANN, H. W. Luteinizing hormone has a stage-limited effect on preantral follicles development *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 320-327, jul. 2000.

XIAO, Y. T.; XIANG, L. X.; SHAO, J. Z. Bone morphogenetic protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 362, p. 550-553, 2007.

XU, Z.; GARVERICK, H. A.; SMITH, G. W.; SMITH, M. F.; HAMILTON, S. A.; YOUNGQUIST, R. S. Expression of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 951-7, oct. 1995.

YANAGISHITA, M.; HASCALL, V. C.; RODBARD, D. Biosynthesis of proteoglycans by rat granuloma cells cultured *in vitro*: modulation by gonadotropins, steroid hormones, prostaglandins, and a cyclic nucleotide. **Endocrinology**, v. 109, p. 1641-1649, nov. 1981.

YING, Y.; LIU, X. M.; MARBLE, A.; LAWSON, K. A.; ZHAO, G. Q. Requirement of BMP8b for the generation of primordial germ cells in the mouse. **Molecular Endocrinology**, v. 14, p. 1053-1063, jul. 2000.

YOUNG, J. M.; MCNEILLY, A. S. Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. **Reproduction**, v. 140, p. 489-504, oct. 2010.

ZHANG, P.; LOUHIO, H.; TUURI, T.; SJOBERG, J.; HREINSSON, J.; TELFER, E. E.; HOVATTA, O. *In vitro* effect of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate (cAMP) on early human ovarian follicles. **Journal of Assisted Reproduction Genetic**, v. 21, p. 301-306, aug. 2004.

ZHAO, J.; TAVERNE, M. A. M.; VAN DER WEIJDEN, B. C.; BEVERS, M. M.; VAN DEN HURK, R. Effect of activin A on *in vitro* development of rat preantral follicles and localization of activin A and activin receptor II. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 967-977, sep. 2001.

ZHOU, H.; ZHANG, Y. Regulation of *in vitro* growth of preantral follicles by growth factors in goats. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 28, p. 235-242, apr. 2005.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News in Physiological Sciences**, v. 19, p. 124-28, jun. 2004.